

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR L'ACTION TRANSFERANTE DES PHOSPHATASES VEGETALES

THÈSE

*présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris
par*

Jacques SERVANT

Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Licencié ès-Sciences

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention PHARMACIE)

soutenue le

1958 devant la Commission d'examen

MM. J. COURTOIS, Président

A. GERMAN

P. MALANGEAU

A. DESJOBERT

} Assesseurs

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES
SUR L'ACTION TRANSFERANTE
DES PHOSPHATASES VEGETALES

THÈSE

*présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris*

par

Jacques SERVANT

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Licencié ès-Sciences



pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention PHARMACIE)

soutenue le

1958 devant la Commission d'examen

MM. J. COURTOIS, *Président*

A. GERMAN

P. MALANGEAU

A. DESJOBERT

} *Assesseurs*

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE, Doyen, Membre de l'Institut
R. DELABY, Assesseur
G. CUVIER, Secrétaire Général

MM. JEANDEL, Secrétaire - QUILLIOT, Rédacteur - Mme ESPINASSE,
Rédactrice - Mlle DENNY, Rédactrice - Mlle BERIL, Rédactrice -
Mlle CELLIER, Commis - Mlle MORIN, Commis - Mlle BIDEAU, Commis -
Mme CARON, Commis.

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut ..	Toxicologie
DELABY	Pharmacie Chimique
JANOT	Pharmacie Galénique
VALETTE	Pharmacodynamie
BEDEL	Législation, Déontologie, et Histoire de la Pharmacie
PARIS	Histoire naturelle des Médi- caments simples d'origine végétale.
GUILLOT	Physique
GAUTIER	Chimie analytique
Mlle LAMBIN	Microbiologie
RAOUL	Zoologie appliquée
COURTOIS	Chimie biologique
DOMANGE	Chimie minérale
CRETE	Botanique
N...	Hygiène et Hydrologie
N...	Chimie organique
MORETTE	Professeur à titre personnel
TRUHAUT	id.
CAVIER	id.
MOREAU	Professeur sans chaire
GUY	id.
GERMAN	id.

Doyen Honoraire : M. RADAIS

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE - LEBEAU, Membres de
l'Institut

HERISSEY - LAUNOY - FLEURY - MASCRE - PICON

MAITRES DE CONFERENCES

MM. PIETTE		Sciences Naturelles
QUEVAUVILLER		Sciences Naturelles
DAMIENS		Sciences Physiques et Chimiques
DEYSSON		Sciences Naturelles
MALANGEAU		Sciences Appliquées
FLAHAUT		Sciences Physiques et Chimiques
RENAULT J.		Sciences Physiques et Chimiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY		Sérologie
BOURDON		Chimie analytique (1 ^è A.)
CORRIEZ		Physique
DESVIGNES		Microbiologie
HARISPE		Chimie Générale et Pharma- ceutique
LECLERC		Chimie biologique
M ^{le} LONGUEVALLE		Service des Examens de Chimie
MM. MANGEOT		Chimie (4 ^{ème} Année)
PELLERIN		Chimie analytique (2 ^è /3 ^è A.)
RENAULT H.		Chimie analytique (2 ^è /3 ^è A.)
SAVEL		Parasitologie
M ^{le} ROLLEN		Biologie végétale

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE et de PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL		Chef de Travaux de Pharma- cotechnie Galénique
M ^{le} MORIN		Chef de Travaux de Pharma- codynamie
M. LUSINCHI		Chef de Travaux de Pharma- cotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Conservateur :..... M. GARNIER

Bibliothécaires : M^{le} LAVAUD
M^{me} KREHMER
M^{mes} DESGRIPPES

A Monsieur le Professeur PAUL FLEURY

Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien-Chef des Hôpitaux psychiâtriques de la Seine,
Officier de la Légion d'Honneur.

A Monsieur le Professeur JEAN COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A Monsieur le Professeur ANDRE DESJOBERT

Maître de Conférences Agrégé de Pharmacie.

A Monsieur CONSTANTIN ANAGNOSTOPOULOS

Docteur Es-Sciences,
Chargé de Recherches au C.N.R.S.

Hommage de profonde reconnaissance.

I N T R O D U C T I O N

Les esters phosphoriques jouent en Biologie un rôle de premier plan : l'intervention des triosephosphates, des hexosephosphates, des nucléotides dans des processus aussi fondamentaux que la glycolyse musculaire et la fermentation alcoolique, celle des phospholipides dans le métabolisme des graisses, en sont quelques aspects.

L'étude des circonstances de leur formation présente, par suite, un grand intérêt, et leur synthèse au sein de la matière vivante constitue un chapitre important de l'Enzymologie : elle met en jeu, par des mécanismes divers, des enzymes parmi lesquels les phosphatases tiennent une place essentielle.

Il existe en effet différents modes de phosphorylation des composés alcooliques par voie biochimique :

- 1) La phosphorylation par "réversibilité d'action" des phosphatases.-

D'une manière générale, une réaction réversible peut être catalysée dans les deux sens par le même enzyme. KASTHE et LOEVENHARDT (33) le montrèrent en 1900 pour la lipase; BOURQUELOT et BRIDEL (9) en 1912 pour l'émulsine;

MARTLAND et ROBISON (39) réalisèrent les premiers la synthèse d'esters phosphoriques à l'aide d'une phosphatase, celle de l'os, en la mettant en présence de solutions concentrées d'orthophosphate et d'un alcool : mannitol, glycérol ou éthylène-glycol.

De nombreux auteurs ont confirmé cette propriété, en utilisant des phosphatases d'origines variées et appartenant à différents groupes de la classification de FOLLEY et KAY légèrement modifiée par ROCHE et COURTOIS (54) : taka-diastrase, SUZUKI et MARUYAMA (56), phosphatases alcalines I du rein et du duodénum, KAY (34), KAY et LEE (35), RAE, KAY et KING (52), THOAI, ROCHE et DANZAS (58), de la glande mammaire, FOLLEY et KAY (27), du sang, ROCHE (53) du lymphome du lapin tuberculeux, MORII (43) des dents, MAC KENZIE (38), du rein, COURTOIS (15), de l'intestin, MEYERHOF et GREEN (41); phosphatases acides II de la graine d'amandier, COURTOIS (17), du foie et de la graine d'amandier, THOAI, ROCHE et DANZAS (58), de la prostate, OHLMEYER (46), MEYERHOF et GREEN (41).

2) La phosphorylation par des kinases.-

Les phosphokinases catalysent le transfert du phosphore terminal de l'acide adénosinetriphosphorique sur un composé alcoolique accepteur. Le terme d'hexokinase a été introduit par MEYERHOF (40) pour désigner l'enzyme de la levure de bière qui catalyse la réaction :



l'hexose pouvant être le glucose, le fructose ou le mannose.

(*) A T P = acide adénosinetriphosphorique.

(**) A D P = acide adénosinediphosphorique.

Une hexokinase a été isolée aussi du cerveau par SOLS et CRANE (55).

La phosphorylation par des kinases a été obtenue également sur des esters phosphoriques d'hexoses (glucose-1 - phosphate, fructose-6-phosphate) sur la choline, la créatine, l'adénine, le glycérol. La glycérokinase mise en évidence par KALCKAR (32) dans la pulpe de rein, par BUBLITZ et KENNEDY (13) dans le foie de rat, catalyse la réaction :



L'uridinetriphosphate peut aussi se prêter à cette réaction. Dans les phosphorylations oxydatives il est vraisemblable que des enzymes du type de la glycérokinase interviennent pour phosphoryler le glycérol à partir de composés riches en énergie. MEYERHOF et GREEN (41) (42) (28) ont montré que de tels corps accélèrent parfois considérablement la synthèse par réversibilité d'action de divers esters phosphoriques d'alcools dont le glycérol, sans que l'équilibre final soit modifié. L'utilisation de phosphore marqué a permis de constater que la majeure partie du phosphore du glycérophosphate formé provenait du dérivé phosphoré et non du phosphate présent. Les donateurs les plus efficaces étaient la phosphocréatine, le phosphopyruvate et surtout l'acétylphosphate. Le p.nitrophénylphosphate est doué de la même propriété; cependant, moins riche en énergie, il est possible qu'il n'intervienne pas par l'intermédiaire d'une kinase, mais participe à une réaction de phosphotransférase.

3) La phosphorylation par "transfert".-

Le transfert de l'un des composés libérés par une hydrolyse enzymatique, sur un accepteur présent dans

la réaction, est un processus biochimique observé avec les enzymes les plus divers.

RABATE (51) le mit en évidence avec une préparation de feuilles de saule, qui se montrait capable, non seulement d'hydrolyser des β glucosides de phénols, mais encore de réaliser, en présence d'un alcool tel que le méthanol, et aux seuls dépens d'une partie du glucose libéré, la synthèse du méthylglucoside.

De nombreux transferts d'oses ont ainsi été observés avec des enzymes d'origines diverses : invertine, émulsine, lactase et plus récemment α D galactosidase de la graine de café, ANAGNOSTOPOULOS, COURTOIS et PETEK (1). Des réactions de transfert ont été mises en évidence avec des protéinases, BERGMANN et FRAENKEL-CONRAT (8), avec des peptidases, HANES, HIRD et ISHERWOOD (29).

Le transfert du radical orthophosphorique par voie enzymatique a fait l'objet de nombreuses observations. Le donateur est le plus souvent un ester orthophosphorique ~~d'alcool ou de phénol~~, possédant une liaison phosphorée riche en énergie : phosphopyruvate, créatinephosphate, acétylphosphate et surtout adénosinetriphosphate.

Les travaux relatifs à des transferts à partir de monoesters orthophosphoriques d'alcools ou de phénols ont été jusqu'ici assez fragmentaires. AXELROD (4) (5) signala que certaines phosphatases végétales, en particulier celle de l'orange, étaient capables de catalyser, sans intervention des nucléotides de l'adénine, le transfert du radical orthophosphorique à partir d'esters de phénols sur un certain nombre d'accepteurs à fonction alcool. Les donateurs utilisés étaient le phénylphosphate, le p.nitrophénylphosphate ou le phénolphtaléinephosphate. La valeur du transfert après une certaine durée de contact était indiquée par la quantité d'acide phosphorique déficitaire, c'est-à-dire par la différence entre le phénol et

l'orthophosphate dosables au bout de ce temps. Le méthanol, l'éthanol, le glycérol se montrèrent d'excellents accepteurs, au contraire l'acide lactique, l'acide malique, l'inositol ne furent le siège d'aucun transfert.

BRAVERMAN et CHARGAFF (10) (11) avec la phosphatase de l'orge germée ont obtenu le transfert du radical phosphoré du phénylphosphate sur des nucléosides du ribose et du désoxyribose, réalisant ainsi la synthèse des nucléotides.

ANAGNOSTOPOULOS et LINO (2) ont étudié l'activité transférante de préparations de graines (Avoine, brome, blé) en utilisant comme donateur le p.nitrophénylphosphate et comme accepteur le méthanol.

Les phosphatases d'origine animale se montrent également capables de catalyser le transfert de l'acide orthophosphorique, et cette propriété a fait l'objet de travaux plus nombreux que pour les phosphatases végétales. L'activité transphosphorylante a en effet été reconnue :

1) Chez les phosphatases alcalines I de la muqueuse intestinale, MEYERHOF et GREEN (41) (42) (28), MORTON (44), du lait, MORTON (44).

2) Chez les phosphatases acides II de l'urine, AXELROD (4), de la prostate, APPLEYARD (3), MORTON (44), BRAVERMAN et CHARGAFF (10), du sperme, GREEN et MEYERHOF (28).

Nous nous sommes proposés, dans ce travail, d'étudier l'action transférante des phosphomonoestérases empruntées à des préparations de sucs de fruits (Orange, pomme), de feuilles (Belladone) et de graines (Moutarde blanche).

A l'aide des préparations d'orange et de pomme nous avons cherché à préciser la spécificité de cette activité.

La préparation de moutarde ayant montré un pouvoir transférant très faible, nous avons été amené à rechercher les causes de cette déficience.

Nous avons ensuite étudié quelques points de la cinétique des transferts, ce qui nous a permis de déterminer les conditions les plus favorables à réaliser pour obtenir le rendement maximum en ester phosphorique synthétisé.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons réalisé deux synthèses enzymatiques, celles d'un glycéro-phosphate et d'un sorbitol-phosphate, et l'isolement de ces deux esters. Leur analyse nous a permis de constater que le transfert du radical orthophosphorique s'était effectué sur une fonction alcool primaire de l'accepteur.

Nous exprimons notre respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur P. FLEURY qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous prodiguer, avec ses précieux conseils, de constants encouragements.

Monsieur le Professeur J. COURTOIS nous a fourni le sujet de ce travail et en a dirigé l'exécution. Ses conseils éclairés et sa grande bienveillance nous ont été particulièrement précieux. Il nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Nous adressons tous nos remerciements à Messieurs les Professeurs MALANGEAU et GERMAN qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Monsieur le Professeur A. DESJOBERT nous a fait profiter de sa grande expérience des esters phosphoriques en dirigeant la deuxième partie de notre travail. Il ne

nous a ménagé ni ses conseils ni sa peine. Il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

Nous sommes également reconnaissant à Monsieur ANAGNOSTOPOULOS, Chargé de Recherches au C.N.R.S., de l'amabilité avec laquelle il n'a cessé de faciliter notre tâche en mettant à notre disposition son expérience dans le domaine de l'Enzymologie.

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDE DU TRANSFERT AVEC DIFFERENTES PHOSPHATASES D'ORIGINE VEGETALE

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

A/- DONATEURS DE PHOSPHORE.-

Deux substrats ont été utilisés : l'acide phénylphosphorique et l'acide p.nitrophénylphosphorique.

Le monoester orthophosphorique du phénol est préparé par phosphorylation du phénol avec l'acide phosphorique anhydre, selon la technique décrite par DESJOBERT (24); il est purifié sous forme de sel de baryum^(*).

Le monoester orthophosphorique du p.nitrophénol est synthétisé selon une technique similaire^(**) et obtenu

(*) Nous remercions Monsieur LANGLOIS qui a bien voulu préparer ce corps à notre intention.

(**) DESJOBERT (A.)- Mémoire en cours de rédaction.

à l'état d'acide libre cristallisé (*).

A partir du phénylphosphate de baryum sont préparées des solutions 0,02 M ou 0,05 M, dont le métal est ensuite précipité par la quantité juste suffisante d'acide sulfurique normal. Les solutions acides des deux esters sont amenées à pH 5,2 par addition de soude normale, puis ajustées exactement au titre convenable. Elles sont conservées à la glacière à + 2° en présence d'une goutte de chloroforme, mais cette conservation n'est que de très courte durée dans le cas du p.nitrophénylphosphate.

B/- PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES.-

Nous avons utilisé des préparations d'orange, de pomme, de moutarde blanche et de belladone.

ORANGE

Les oranges douces employées provenaient d'Espagne ou d'Afrique du Nord. Une première appréciation de leur activité enzymatique était obtenue en partant du jus passé sur une gaze, puis centrifugé à 3.000 t/minute. C'est à partir de tels sucs d'orange, dont l'activité phosphatasique avait paru satisfaisante, que nous avons procédé aux premiers essais de transfert.

Pour l'obtention d'une préparation enzymatique partiellement purifiée nous avons fait appel à la précipitation par l'acétone :

Le suc d'orange recueilli par expression est passé sur gaze et clarifié par centrifugation à 3.000 t/minute pendant une demi-heure.

(*) Nous remercions Monsieur DESJOBERT qui a bien voulu préparer le p.nitrophénylphosphate nécessaire à nos expériences.

La filtration sur papier, très laborieuse en raison du colmatage du filtre, ne permettrait d'obtenir qu'une proportion très faible du produit. L'emploi d'un broyeur du type Turmix est également à proscrire car il donne un suc contenant de la cellulose et des hémicelluloses en suspension extrêmement fine, par suite très difficiles à séparer.

Le suc refroidi à la température de -10° est additionné de 3 volumes d'acétone préalablement refroidie à -10° . Après une demi-heure de séjour au réfrigérateur à -20° , nous centrifugeons à vitesse moyenne pendant un quart d'heure.

Le culot de centrifugation est repris par le minimum d'eau distillée et reprécipité par 3 volumes d'acétone refroidie. Cette opération est répétée 2 fois.

Le précipité est desséché sous vide phosphorique. Nous avons ainsi obtenu, en partant de 3 kg 300 d'orange, un litre de suc et 0 gr 850 de préparation enzymatique sous la forme d'une poudre parfaitement blanche et soluble dans l'eau.

POMME

Nous avons utilisé la pomme normande de la région de Mantes. Les essais préliminaires étaient effectués avec le suc obtenu par expression, passé sur gaze et centrifugé à la vitesse de 3.000 t/minute pendant un quart d'heure.

Une préparation enzymatique par précipitation acétonique a été obtenue selon la même méthode que pour l'orange. Un litre de jus de pomme a produit 1 gr 10 d'une poudre brune dont la solution aqueuse reste légèrement trouble, ce qui nécessite sa centrifugation si l'on pratique les dosages par photométrie.

BELLADONE

La préparation de belladone est obtenue par extraction de la poudre officinale de feuilles desséchées avec 10 parties de solution de chlorure de sodium à 8 pour mille. La phase liquide, séparée par filtration et refroidie à -10° est précipitée par 3 volumes d'acétone préalablement refroidie à -10° . Le précipité, séparé par centrifugation, est desséché sous vide phosphorique. Cent grammes de feuilles ont permis d'obtenir 3 gr 750 d'une poudre brunâtre soluble dans l'eau.

MOUTARDE

Nous avons réalisé des essais avec trois préparations phosphatasiques de graines de moutarde blanche (Sinapis alba Crucifères).

- 1) Préparation de moutarde (I) : extrait aqueux à 2 p.100 de poudre de graines de moutarde délipidées par l'éther obtenu par agitation mécanique puis centrifugation.
- 2) Préparation purifiée de moutarde (II) : cinquante grammes de poudre de moutarde obtenue par broyage au Turmix sont mis au contact de 250 gr d'eau distillée, à la glacière, pendant 3 jours en agitant de temps en temps. Le mélange est passé sur une toile fine, puis sur un filtre plissé. La filtration, laborieuse, est pratiquée dans la glacière. Le filtrat est additionné de trois volumes d'acétone refroidie et laissé à la glacière une demi-heure. On centrifuge une demi-heure à vitesse moyenne. Le culot, séparé, est desséché sous vide phosphorique : 100 ml de filtrat ont permis d'obtenir 2 gr 28 de poudre.

- 3) Préparation purifiée de moutarde (III) : La poudre de graines de moutarde est délipidée par lixiviation par l'éther à la chambre froide jusqu'à obtention d'un liquide incolore, puis mise en suspension dans 5 parties de solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000 et abandonnée pendant 24 heures au frigidaire à + 3° en agitant de temps en temps. La suspension est passée sur gaze : Le liquide trouble obtenu est centrifugé. On décante le liquide clair et on l'additionne de sulfate d'ammonium en quantité calculée pour avoir 33,3 p. 100 de saturation à 0° . Après une nuit de repos, le précipité est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est additionné de sulfate d'ammonium en quantité calculée pour avoir 80% de saturation. On abandonne une nuit et on centrifuge. Le liquide surnageant est éliminé et le précipité est dissout immédiatement dans une petite quantité d'eau (environ le 1/10° du volume du précipité). Cette solution est introduite dans un sac de cellophane et dialysée contre de l'eau distillée jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium (réaction négative des ions SO_4^{4-} sur une solution de chlorure de baryum).

Le liquide est alors additionné de trois volumes d'acétone refroidie à -20° et maintenu pendant une demi-heure à une température de -6° à -10°. Le précipité est séparé par centrifugation et desséché sous vide phosphorique. Il est repris par l'eau (la moitié de son volume) et la solution est additionnée d'acétone refroidie à -20° en quantité telle qu'on obtienne une concentration de 20 p.100 en acétone. Le précipité qui se forme est éliminé par centrifugation (il ne possède qu'une très faible activité). Le liquide surnageant est additionné d'acétone refroidie de façon à atteindre une

concentration de 40 p.100 dans le milieu; la fraction qui précipite possède 80 p.100 de l'activité totale; (environ 15 p.100 de l'activité se trouveraient dans la fraction précipitant entre 40 et 60 p.100 de concentration en acétone).

Le précipité est desséché sous vide phosphorique.

C/- PROTOCOLE DES EXPÉRIENCES.-

Les essais ont été effectués à 37°, dans des tubes stériles de 18 cm x 1,8 cm bouchés au caoutchouc. Nous y mesurons dans l'ordre :

(Substrat 0,02 M ou 0,05 M	2 ou 5 ml
(Suspension de la préparation enzymatique à 1 mg/ml ou 10 mg/ml	1 ml
(Solution d'accepteur	quantité variable selon les cas
(Tampon acétique à pH 5,2	0,5 ml
(Eau q.s pour compléter à	10 ml

Le tampon le plus souvent utilisé a pour formule :

(Acide acétique 10 N	100 ml
(Soude 10 N	68 ml
(Eau distillée q.s pour	400 ml

0,5 ml de ce tampon, dans le milieu réactionnel porté à 10 ml, équivaut à 5 ml du tampon acétique M/4. L'emploi de cette formule concentrée permet de réserver une plus grande quantité d'eau à la dissolution de certains accepteurs peu solubles.

D/- TECHNIQUES ANALYTIQUES.-

- 1) DOSAGE DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE LIBERE.- Il est effectué selon la méthode de BRIGGS (12). Principe :

Lorsqu'on met en présence d'une solution contenant des ions orthophosphoriques, un excès de molybdate et un réducteur (polyphénol et sulfite) il se produit un complexe phosphomolybdeux - molybdique d'une coloration bleue dont l'intensité est directement proportionnelle à la dose d'acide orthophosphorique.

Réactifs utilisés :

Réactif sulfo-molybdique

(Molybdate d'ammonium	5 gr
(SO^4H^2 pur	15 ml
(Eau distillée q.s pour	100 ml

Ce réactif sera laissé quelques jours au repos et décanté.

Solution de sulfite

(Sulfite de sodium anhydre	4 gr
(Eau distillée q.s pour	20 ml

ou

(Dilution récente au 1/5ème de la solution de bisulfite	
(de sodium codex.	

Solution d'hydroquinone

à préparer extemporanément

(Hydroquinone	0,100 gr
(SO^4H^2 à 10 p.100	2 gouttes
(Eau distillée q.s pour	20 ml

Le dosage colorimétrique est réalisé de la façon suivante :

Dans un tube à essais de 22 cm x 2 cm on introduit successivement :

Prise d'essai	6 ml
Réactif sulfomolybdique	2 ml
Solution de sulfite	1 ml
Solution d'hydroquinone	1 ml

La coloration bleue se développe et atteint son maximum au bout de 30 minutes. On apprécie son intensité à l'électrophotomètre de Vernes, Bricq et Constant, grâce à une courbe de référence établie avec une solution étalon de phosphate monopotassique pur anhydre à 0,43885 gr par litre, conservée en flacon bouché à l'émeri en présence de quelques gouttes de chloroforme. Cette solution contient 100 microgrammes de P par ml. La courbe de référence et les dosages sont effectués avec la cellule au coesium, sans surcharge et avec le filtre n° 7 (longueur d'onde : 4.500 Å).

2) DOSAGE DU PHENOL LIBERE. - Il est pratiqué par la méthode de FOLIN et DENIS formule de WU (60). Principe :

Le réactif phosphotungstomolybdique donne en milieu alcalin avec les corps à fonction phénol libre, une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en phénol.

Réactifs utilisés :

Réactif dit des phénols de FOLIN et DENIS

(Tungstate de sodium	100 gr
(Molybdate de sodium	25 gr
(Eau distillée	700 ml

Après dissolution, ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85 p.100 et 100 ml d'acide chlorhydrique concentré. Faire bouillir à reflux pendant 8 heures, laisser refroidir et compléter à 1 litre. Si le réactif acquiert à la longue une teinte verdâtre, la ramener à teinte jaune par addition de quelques gouttes de solution de permanganate de potassium.

Solution alcaline

{ Carbonate de sodium cristallisé à 10 OH ₂	60 gr
{ Eau q.s pour	300 ml

Faire dissoudre, filtrer, ajuster à 300 ml puis ajouter NaOH en solution normale 200 ml

Dans un tube à essais de 22 cm x 2 cm sont mesurés successivement :

Prise d'essai	7 ml
Réactif des phénols dilué au 1/3	3 ml
Solution alcaline	2,5 ml

On agite rapidement et plonge le tube dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes. On refroidit et on apprécie la coloration à l'électrophotomètre de VERNES, BRICQ et CONSTANT (cellule au coesium sans surcharge, filtre n° 7 - longueur d'onde : 4.500 Å), en se reportant à une courbe de référence établie avec une solution étalon de phénol redistillé pur et sec à 0,200 gr pour 100 ml que l'on dilue au centième pour l'emploi. Cette dilution contient 100 microgrammes de phénol pour 5 ml.

3) DOSAGE DU p.NITROPHENOL LIBERE.-

Le dosage du p.nitrophénol libéré est effectué en appréciant au photomètre la coloration jaune qui se développe en milieu franchement alcalin, grâce à une courbe

de référence établie avec une solution alcaline de nitro-phénol.

Le réglage du photomètre de VERNES, BRICQ et CONSTANT est le suivant : cellule à l'antimoine, pas de surcharge, filtre n° 6 (longueur d'onde $3.900 \text{ \AA}$).

Dans un tube à essai sont mesurés :

Prise d'essai	2 ml
Soude normale	2 ml

4) TEMOINS.-

De chaque mesure photométrique est déduite l'absorption propre des réactifs, déterminée sur un tube témoin. Si la présence de l'accepteur ou de l'enzyme introduit un très léger trouble, une très légère coloration, cette surcharge est mesurée et déduite des déterminations.

Dans tous les essais nous vérifions que l'accepteur introduit ne modifie pas les déterminations analytiques : c'est ainsi que les sucres réducteurs à fortes concentrations réduisent le réactif des phénols; que le mannitol et le sorbitol perturbent le dosage du phosphore par la méthode de BRIGGS, ce qui nous a obligés à pratiquer une précipitation ammoniac-magnésienne :

Dans un tube à centrifuger à fond rond de 7 cm x 2 cm, nous introduisons :

Milieu réactionnel	1 ml
Eau distillée	7 ml
Mixture magnésienne	2 ml
Ammoniaque	5 ml

Après avoir soigneusement mélangé, nous abandonnons au moins 12 heures, au plus 24 heures. Nous centrifugeons 20 minutes à grande vitesse, nous décantons. Le culot n'est pas lavé (ce qui nous exposerait à des pertes) mais

dissout directement dans 2 ml de réactif sulfomolybdique auxquels sont ajoutés 6 ml d'eau distillée, 1 ml de solution de sulfite et 1 ml de solution d'hydroquinone.

Chaque série d'essais comporte un tube dans lequel l'accepteur est remplacé par un égal volume d'eau. Ceci a pour but :

- 1) de suivre l'activité phosphatasique en dehors de tout transfert.
- 2) de contrôler réciproquement les deux techniques analytiques, l'hydrolyse du substrat devant libérer des quantités équimoléculaires de ses deux constituants.
- 3) de vérifier que la préparation enzymatique ne renferme pas, soit des accepteurs éventuels, soit des dérivés phosphorés susceptibles d'être hydrolysés. MEYERHOF et GREEN (28) (41) ont, en effet, démontré que divers composés phosphorés à liaison riche en énergie (acide créatinephosphorique, phosphopyruvique, acétylphosphorique et adénosinetriphosphorique) accélèrent le transfert et augmentaient transitoirement la proportion d'accepteur phosphorylé. Ces dérivés phosphorés sont probablement analogues, sinon identiques, aux substances accélérant la biosynthèse des esters phosphoriques par réversibilité d'action de la phosphatase; ces activateurs labiles ont été décelés par NGUYEN VAN THOAI, ROCHE et DANZAS (58) dans les préparations phosphatasiques non purifiées. Les préparations enzymatiques que nous avons utilisées ne renfermaient pas en proportion décelable d'accepteur de phosphate ou de dérivé phosphoré activateur.

DISPOSITIF D'EXPERIENCE

Les chiffres expriment des ml

Tubes n°	1	2		T1	T2
Phénylphosphate de sodium 0,02 M	2	2		2	2
Préparation enzymatique d'orange à 1 mg/ml	1	0		1	0
Préparation enzymatique de pomme à 1 mg/ml	0	1		0	1
Méthanol	2	2		0	0
Tampon pH 5,2 concentré	0,5	0,5		0,5	0,5
Eau distillée	4,5	4,5		6,5	6,5

Les dosages de phénol et d'acide orthophosphorique pratiqués sur des parties aliquotes de ces milieux au bout de n minutes ou heures d'incubation, permettent de connaître :

- 1) les quantités absolues de phénol et d'acide phosphorique libérés par l'hydrolyse.
et à partir de ces données calculer :

- 2) les quantités libérées pour cent des quantités engagées sous forme de substrat.
- 3) les quantités d'acide phosphorique déficitaires, c'est-à-dire transférées sur l'accepteur.

Si nous exprimons par Sc le pourcentage de substrat scindé, apprécié en déterminant le composé phénolique libéré, par a le pourcentage de phosphore du substrat, libéré sous forme d'acide orthophosphorique, la différence Sc - a correspond au pourcentage du phosphore transféré sur l'accepteur par rapport au phosphore initialement présent dans le donateur.

Nous désignerons par T le pourcentage de phosphore transféré sur l'accepteur par rapport au substrat scindé, c'est-à-dire le rapport :

$$T = \frac{Sc - a}{Sc} \times 100$$

CHAPITRE II

ESSAIS PRELIMINAIRES D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT

Nos premiers essais ont été effectués en utilisant des préparations d'orange et de pomme.

A/- PREPARATIONS D'ORANGE.-

1) ESSAIS D'HYDROLYSE

Dans une première série d'essais en vue d'apprécier l'activité phosphatasique des extraits de fruits que nous aurions à utiliser, nous nous sommes contentés de mettre en présence, pour un volume total de 10 ml, le phénylphosphate de sodium à la concentration 0,002 M, le tampon acétique et 1 ml de jus d'orange.

En dépit des corrections apportées, le trouble du suc végétal et sa teneur élevée en phénols introduisaient une cause d'erreur trop importante.

C'est pourquoi nous avons réduit au dixième (soit 0,1 ml) le volume du jus d'orange et porté à 0,004 M la concentration en substrat. La vitesse de réaction s'en est trouvée diminuée notablement (11,2 p. 100 d'hydrolyse au lieu de 85 p.100 en 24 heures), mais les dosages devenaient plus rigoureux, ce qui se traduisait par un meilleur parallélisme entre les quantités d'acide orthophosphorique et de phénol libérés.

TABLEAU I

HYDROLYSE DU PHENYLPHOSPHATE PAR LE JUS D'ORANGE

Durée de la réaction en jours	Acide orthophospho- rique libéré p.100	Phénol libéré p.100
1	11,2	9,6
2	25,0	25,5
3	33,6	36,2
4	41,0	38,4
6	53,0	51,0
8	63,0	59,5

Phénylphosphate 0,02 M : 2 ml -Tampon acétique pH 5,2 : 7 ml-
Jus d'orange dilué au 1/10ème : 1 ml - Volume total : 10 ml -
Incubation à 37° -

Le tableau I montre que, même à dose réduite, le suc d'orange introduit une source d'erreurs trop importante dans le dosage des phénols par la méthode que nous utilisons. De plus une si faible quantité d'enzyme exige 8 jours d'incubation pour provoquer 60 p.100 d'hydrolyse du substrat.

La même expérience faite en remplaçant le suc d'orange par le précipité acétonique du suc d'un autre lot d'oranges donna une hydrolyse aussi lente (56 p.100 du substrat mis en oeuvre scindé en 8 jours), mais un paral-

lélisme très bon entre les deux constituants libérés (tableau II).

Compte tenu de l'inactivation de l'enzyme, nous étions en présence d'oranges de faible activité phosphatase, mais obtenions un contrôle satisfaisant des méthodes analytiques utilisées. L'équivalence des quantités d'acide orthophosphorique et de phénol libérées indiquait en outre que, sans addition d'accepteur, l'enzyme ne provoquait que la réaction hydrolytique



TABLEAU II

HYDROLYSE DU PHENYLPHOSPHATE PAR UN PRECIPITE ACETONIQUE
DE JUS D'ORANGE

Durée de la réaction en jours	Acide orthophospho- rique libéré p.100	Phénol libéré p.100
4	38,6	39,0
6	50,0	49,0
8	56,5	55,5
Phénylphosphate de sodium 0,02 M : 2 ml - Tampon acétique pH 5,2 : 7 ml - Précipité acétonique de 2 ml de jus - Volume total : 10 ml - Température 37° -		

2) ESSAIS DE TRANSFERT

a) A partir du phénylphosphate

Nos premiers essais de transfert ont été effectués en utilisant comme substrat le phénylphosphate et comme accepteur le méthanol qui s'était montré très satisfaisant dans les expériences d'AXELROD.

TABLEAU III

TRANSFERT A PARTIR DU PHENYLPHOSPHATE SOUS L'INFLUENCE DE LA PREPARATION II D'ORANGE, LE METHANOL ETANT ACCEPTEUR

Durée de la réaction en jours	Sans méthanol		Méthanol 2,5 M		
	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	T (*)
1	31,0	30,6	47,5	37,0	22
3	72,0	73,5	82,0	47,0	42
6	95,0	100,0	100,0	71,0	29

Phénylphosphate de sodium 0,02 M : 2 ml - Méthanol : 1 ml, c'est-à-dire environ 2,5 M dans le milieu - Précipité acétonique II correspondant à 0,4 ml de jus d'orange - Tampon pH 5,2 : 5 ml - Volume total : 10 ml - Température 37° -

(*) T = Pourcentage de l'acide phosphorique transféré par rapport au substrat scindé.

Le tableau III montre un bon parallélisme acide phosphorique-phénol dans l'essai sans méthanol et, en présence de l'accepteur un bon pourcentage de transfert, atteignant 42 en trois jours et réduit à 29 au bout de 6 jours.

Il est à noter, et ce fait sera observé constamment dans les expériences ultérieures que, en un temps donné, on trouve davantage de phénol libéré dans le tube contenant l'accepteur que dans celui qui n'en contient pas.

L'expérience suivante (tableau IV) a été effectuée avec le phénylphosphate comme substrat et le méthanol

TABLEAU IV

TRANSFERT A PARTIR DU PHENYLPHOSPHATE SOUS L'INFLUENCE DE LA PREPARATION III D'ORANGE, LE METHANOL ETANT ACCEPTEUR

Durée de la réaction en jours	Sans méthanol		Méthanol 2,5 M		
	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	T (*)
0,5	16,0	15,5	19,0	10,0	47
1	26,6	27,4	30,0	13,7	53
3	57,0	57,0	65,0	25,0	61
5	70,0	72,5	81,0	29,0	64
7			83,0	33,0	60

Phénylphosphate de sodium 0,02 M : 2 ml - Méthanol:1 ml c'est-à-dire environ 2,5 M dans le milieu - Précipité acétonique III correspondant à 1,2 ml de jus d'orange : 1 mg - Tampon pH 5,2: 5 ml - Volume total : 10 ml - Température 37° -

(*) T = Pourcentage de l'acide phosphorique transféré par rapport au substrat scindé.

comme accepteur, mais à l'aide d'une préparation enzymatique III d'orange dont l'activité s'était révélée supérieure à celle de la préparation précédente et qui devait constituer notre enzyme stock pour toutes les expériences suivantes. Nous avons obtenu 0,850 gr de cet enzyme à partir d'un litre de jus d'orange.

L'enzyme III a une nette activité hydrolysante (70 p.100 en 5 jours). Le rapport acide orthophosphorique
phénol en l'absence d'accepteur est satisfaisant.

En présence de méthanol le transfert T, exprimé en pourcentage de l'acide phosphorique transféré, par rapport au substrat scindé, atteint 64 en 5 jours.

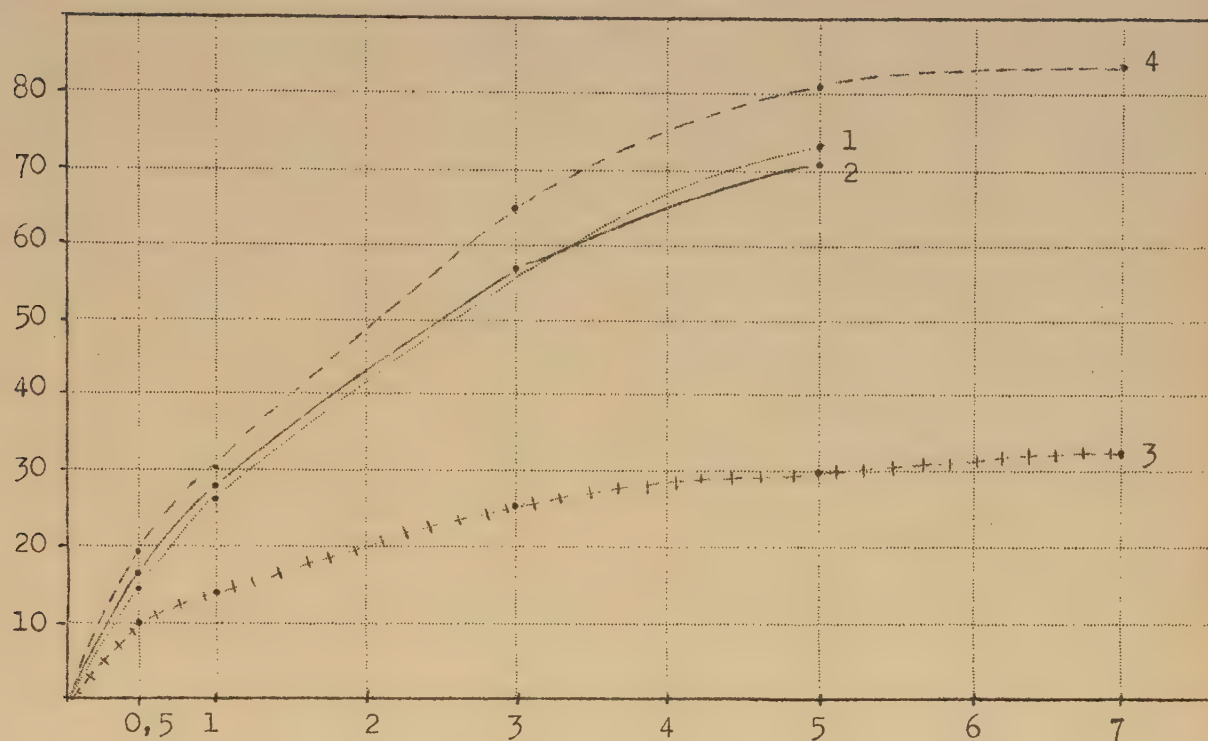
Comme dans l'expérience précédente la quantité de phénol libéré est notablement plus importante (81 p.100 au lieu de 70) en présence de méthanol.

On constate en outre que si, pendant la première phase, le transfert T augmente rapidement, il devient bientôt indépendant de la durée de la réaction enzymatique : la courbe qui réunit les valeurs successives de T en fonction du temps tend à devenir une parallèle à l'axe des abscisses.

Les figures 1 et 2 réunissent les résultats de cet essai.

FIGURE 1

Transfert à partir du phénylphosphate sous l'influence de la préparation III d'orange, le méthanol étant l'accepteur.



Abcisses : durée de la réaction en jours

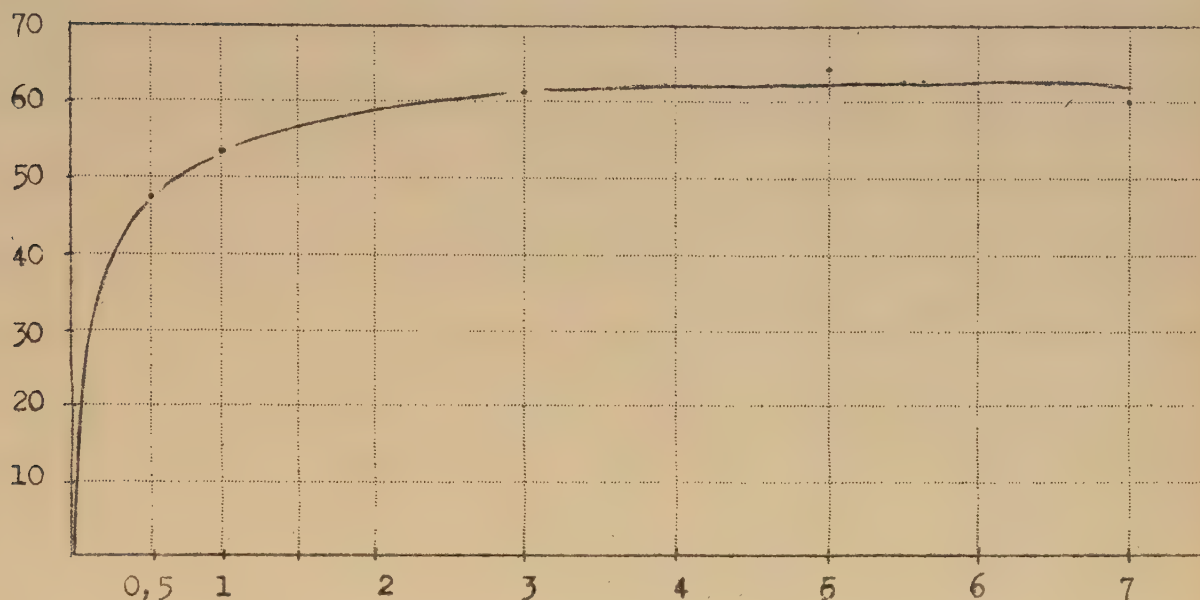
Ordonnées : phosphore ou phénol libéré pour cent de la quantité mise en oeuvre.

Courbe 1 : phosphore libéré { En l'absence d'accepteur.
 Courbe 2 : phénol libéré {

Courbe 3 : phosphore libéré { En présence de l'accepteur.
 Courbe 4 : phénol libéré {

FIGURE 2

Transfert à partir du phénylphosphate sous l'influence de la préparation III d'orange, le méthanol étant l'accepteur.



Abscisses : durée de la réaction en jours.

Ordonnées : phosphore transféré pour cent du substrat scindé.

b) A partir du p.nitrophénylphosphate

L'expérience suivante fait appel au p.nitrophénylphosphate comme substrat à la concentration 0,004 M dans le milieu. L'accepteur est le méthanol 2,5 M et l'enzyme, la préparation III d'orange.

TABLEAU V

TRANSFERT A PARTIR DU p.NITROPHENYLPHOSPHATE SOUS L'INFLUENCE
D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE D'ORANGE (PREPARATION III)
LE METHANOL ETANT ACCEPTEUR

Durée de la réaction en heures	Sans méthanol		Méthanol 2,5 M		
	Nitrophénol libéré p. 100	Acide or- thophos- phorique libéré p.100	Nitrophé- nol libéré p.100	Acide or- thophos- phorique libéré p.100	T(※)
3	12,5	12,0	17,0	7,2	57
8	23,0	22,0	32,0	11,3	64
24	45,0	47,5	72,0	18,5	74
48	70,0	73,5	93,0	24,0	74
96	100,0	100,0	100,0	28,0	72

p.nitrophénylphosphate de sodium 0,02 M : 2 ml - précipité
acétonique III : 1 mg - tampon pH 5,2 : 5 ml - Volume total
10 ml - Température 37° -

(※) T = Pourcentage de l'acide phosphorique transféré par
rapport au substrat scindé.

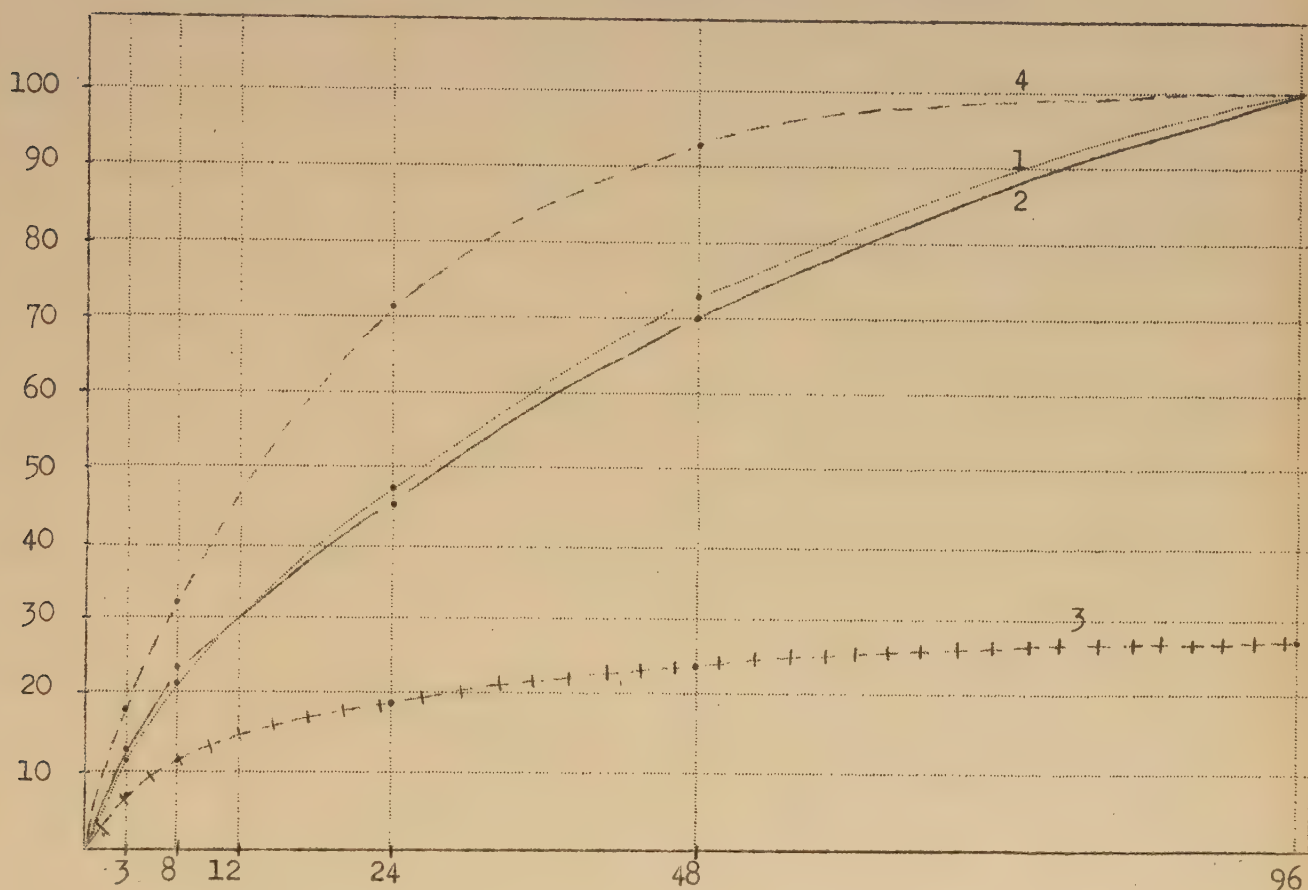
Le rapport $\frac{\text{acide phosphorique}}{\text{nitrophénol}}$ en l'absence d'ac-

cepteur est assez bon. L'hydrolyse s'est montrée plus ra-
pide qu'avec le phénylphosphate : elle atteint 70 p.100 en
2 jours et est complète au bout de 4 jours. Le transfert

est également plus rapide avec ce substrat : il atteint 74 en 24 heures. A partir de ce moment, il reste constant : la courbe qui réunit les valeurs successives de T en fonction du temps devient horizontale (figures 3 et 4). Enfin, dans le même temps, le pourcentage d'hydrolyse est plus élevé en présence de l'accepteur.

FIGURE 3

Transfert à partir du p.nitrophénylphosphate sous l'influence de la préparation III d'orange, le méthanol étant l'accepteur.



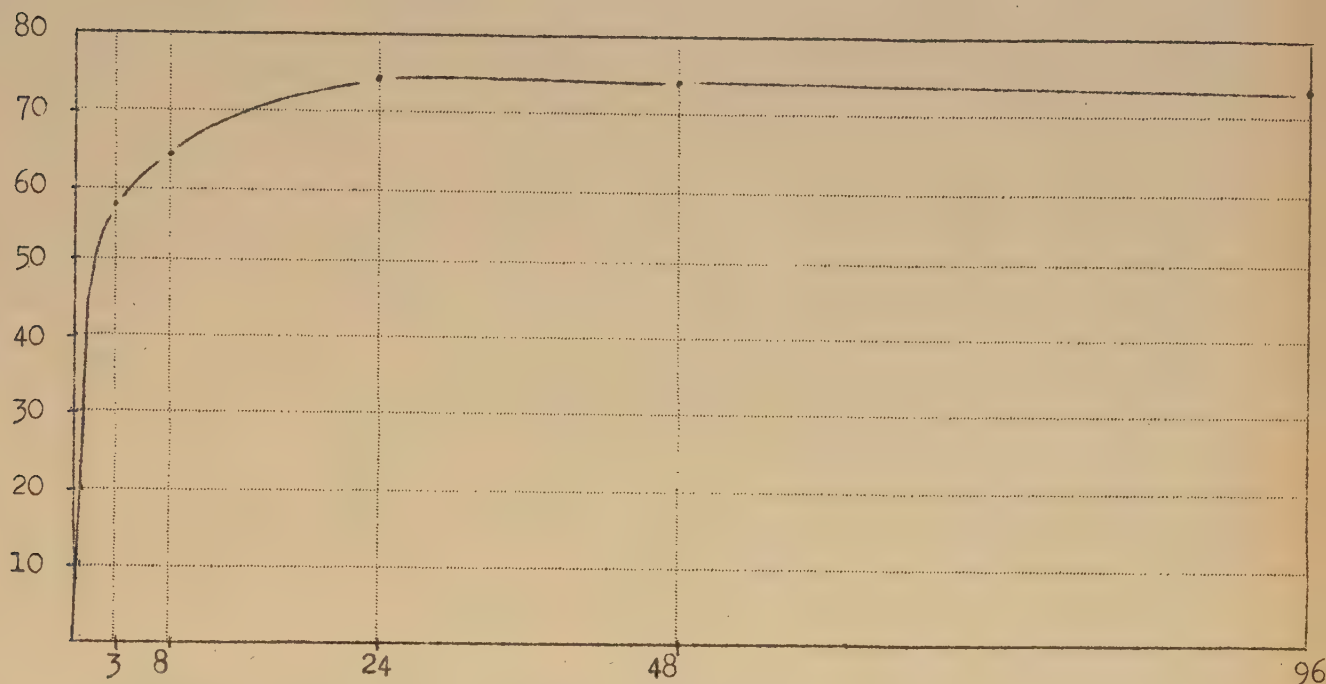
Abscisses : durée de la réaction en heures.

Ordonnées : phosphore ou p.nitrophénol libéré pour cent de la quantité mise en oeuvre.

- | | | |
|---------------------------------|---|----------------------------|
| Courbe 1 : phosphore libéré | { | En l'absence d'accepteur |
| Courbe 2 : p.nitrophénol libéré | | |
| Courbe 3 : phosphore libéré | { | En présence de l'accepteur |
| Courbe 4 : p.nitrophénol libéré | | |

FIGURE 4

Transfert à partir du p.nitrophénylphosphate sous l'influence de la préparation III d'orange, le méthanol étant l'accepteur.



Abscisses : durée de la réaction en heures.

Ordonnées : phosphore transféré pour cent du substrat scindé.

DISCUSSION DES RESULTATS

Les expériences précédentes ont permis de constater que l'orange était douée d'une bonne activité phosphatasique et d'une activité transférasique très nette : avec la préparation enzymatique dont nous disposons, nous avons obtenu un transfert T de 64 avec le phénylphosphate et de 74 avec le p.nitrophénylphosphate.

Si l'on compare les durées d'incubation nécessaires pour obtenir ces résultats on voit qu'elles sont

respectivement de 5 jours pour le phénylphosphate et de 24 heures pour le p.nitrophénylphosphate. En l'absence d'accepteur, l'hydrolyse de 70 p.100 du substrat est réalisée en 5 jours avec le phénylphosphate et en 2 jours avec le p.nitrophénylphosphate. En présence de méthanol, pour un même pourcentage d'hydrolyse de 30 p.100 obtenu en 1 jour avec le phénylphosphate et en 8 heures avec le p.nitrophénylphosphate, le transfert atteint 53 pour le premier et 64 pour le second substrat : le p.nitrophénylphosphate se montre donc, non seulement meilleur substrat d'hydrolyse, mais meilleur donateur de transfert que le phénylphosphate.

Il est permis de penser que l'activité d'un substrat est en relation avec sa constitution, et plus particulièrement avec l'énergie de liaison du radical orthophosphorique.

GREEN et MEYERHOF (28) comparant les vitesses de transfert obtenues avec les phosphatases de l'intestin et du sperme, à partir de différents substrats (phosphopyruvate, acétylphosphate, créatinephosphate et p.nitrophénylphosphate) ont montré qu'il n'y avait pas proportionnalité entre le transfert et l'énergie de liaison du donateur. Il semblerait, d'après ces Auteurs, que l'affinité relative de ce dernier pour l'enzyme, et l'activité du complexe enzyme-substrat qui en résulte, jouent un rôle prépondérant dans le facteur vitesse.

D'après AXELROD (6) le pourcentage du transfert obtenu avec la phosphatase alcaline purifiée selon SCHMIDT et TANNHAUSER est indépendant de l'énergie de liaison du donateur : seule la spécificité de l'enzyme pour le substrat, pour l'accepteur et pour le composé formé, est déterminante.

MORTON (44) comparant le transfert sur le glucose, à l'aide de la phosphatase alcaline, à partir du créa-

tine-phosphate et du glycérophosphate, obtient un pourcentage de transfert légèrement supérieur avec le glycérophosphate.

Ces essais nous ont aussi permis de contrôler les techniques de dosage que nous avons adoptées, par le bon parallélisme observé entre l'acide orthophosphorique et le phénol (ou le nitrophénol) libérés par l'enzyme en l'absence d'accepteur.

Ils nous ont montré que le transfert T, calculé en pourcentage par rapport au substrat scindé, augmente dans une première phase de courte durée, puis demeure constant.

Nous avons observé qu'en présence d'accepteur, et à durée de réaction égale, la libération du phénol ou du p.nitrophénol était toujours plus élevée qu'en l'absence d'accepteur. La scission plus marquée du donateur en présence d'accepteur peut s'expliquer par la différence qui existe dans l'action inhibitrice de l'orthophosphate. Il est bien connu, en effet, (J. COURTOIS (16)) que les orthophosphates sont des inhibiteurs énergiques de l'hydrolyse phosphatasique : en l'absence d'accepteur il y a libération hydrolytique de tout l'orthophosphate du donateur scindé. Au contraire, en présence d'accepteur, une partie du phosphore passe sur cet accepteur, la concentration en orthophosphate se trouve moins élevée et, par suite, l'inhibition est moins importante.

B/- PREPARATIONS DE POMME.-

1) ESSAIS D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT

Un premier essai pratiqué avec le phénylphosphate et le suc de pomme centrifugé n'a pu être exploité, la forte teneur du suc végétal en phénols nécessitant des

corrections importantes et introduisant par suite une marge d'erreur trop considérable.

Un essai de transfert avec la préparation P obtenue par précipitation acétonique, à partir du phénylphosphate à la concentration 0,004 M en présence de méthanol s'est montré satisfaisant. Les résultats de cet essai sont rassemblés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

TRANSFERT A PARTIR DU PHENYLPHOSPHATE SOUS L'INFLUENCE
D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE DE POMME (PREPARATION P)
LE METHANOL ETANT ACCEPTEUR

Durée de la réaction en jours	Sans méthanol		Méthanol 2,5 M dans le milieu -		
	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	Phénol libéré p.100	Acide orthophosphorique libéré p.100	T (*)
2	47,0	48,0	52,0	19,5	62
4	61,5	60,5	75,0	22,0	70
7	62,0	64,0	73,5	22,0	70

Phénylphosphate de sodium 0,02 M : 2 ml - Précipité acétonique
P (correspondant à 1 ml de suc) : 1 mg - tampon pH 5,2 -
Volume total : 10 ml - Température 37° -

(*) T = Pourcentage de l'acide phosphorique transféré par rapport au substrat scindé.

Le jus de pomme utilisé possède une activité phosphatasique satisfaisante : 61,5 p.100 d'hydrolyse en 4 jours, par conséquent comparable à celle de l'orange. Son pouvoir transférant est également élevé, puisque T atteint 70 en 4 jours. Sans accepteur, le rapport : $\frac{\text{acide phosphorique}}{\text{phénol}}$ s'est montré satisfaisant, la quantité de phénol libéré étant, là encore, moins importante qu'en présence de méthanol.

2) DETERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION DE LA PHOSPHATASE DE POMME.

Cette étude a été faite avec 2 substrats différents, le β glycérophosphate de sodium et le phénylphosphate de sodium, les deux étant à la concentration 0,004 M. L'enzyme sous forme de préparation P (précipité acétonique) était introduit à raison d'1 mg, pour un volume total de 10 ml dans 10 solutions dont le pH s'échelonnait de 3,1 à 7 (glycérophosphate) et de 3,9 à 8,7 (phénylphosphate). L'acide orthophosphorique fut déterminé dans chaque essai au bout de 3 jours d'incubation à 37°.

Les figures 5 et 6 en représentent les résultats.

FIGURE 5

Hydrolyse du glycérophosphate 0,004 M par l'enzyme de pomme.

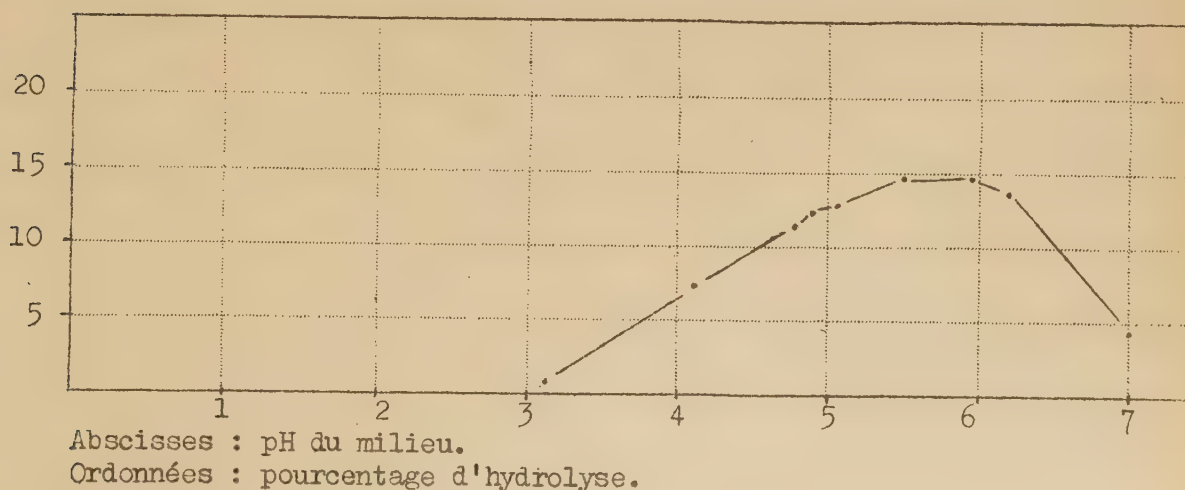
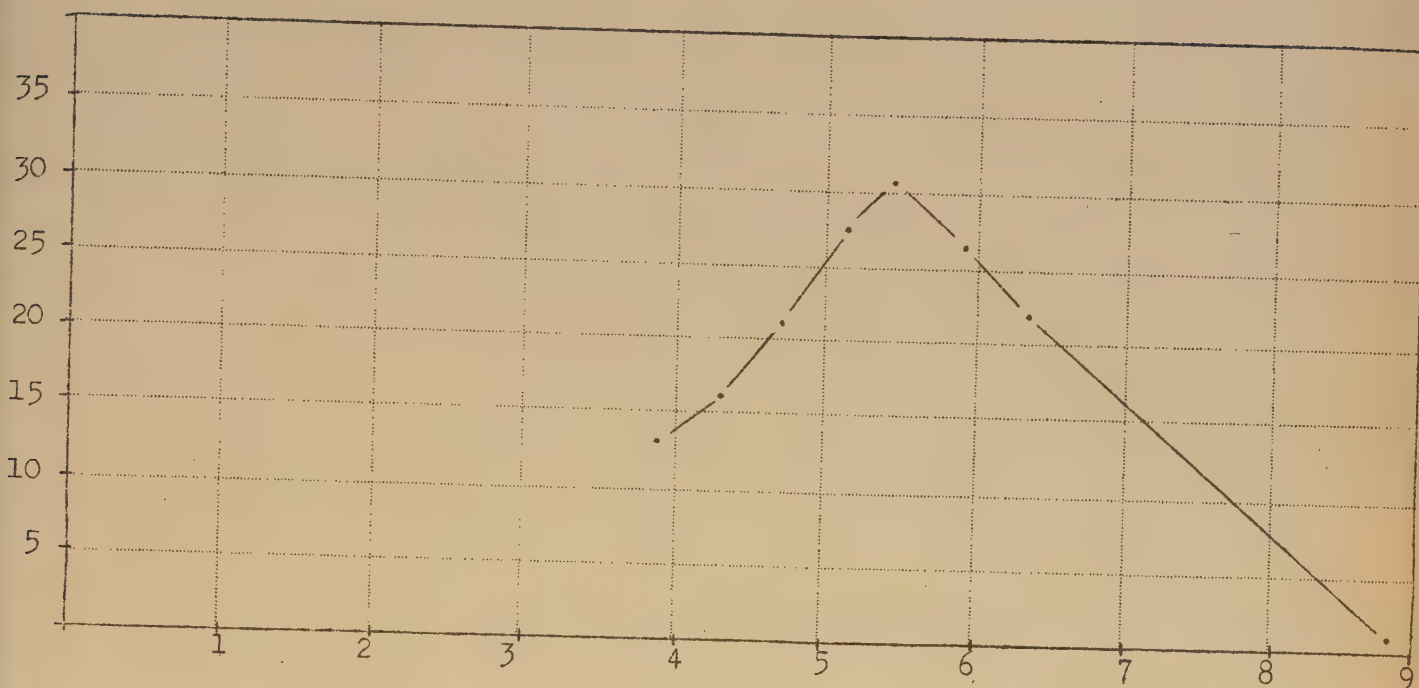


FIGURE 6

Hydrolyse du phénylphosphate 0,004 M par l'enzyme de pomme.



Abscisses : pH du milieu.

Ordonnées : pourcentage d'hydrolyse.

Le pH optimum d'activité phosphatasique de l'enzyme de pomme se situe à 5,4 - 5,5.

La phosphatase de la pomme peut donc être classée comme une phosphatase du type II, ainsi que celles de l'orange et de la plupart des végétaux supérieurs qui les contiennent, soit dans leurs racines ou tubercules (radis, pomme de terre), soit dans leurs graines (blé, moutarde, ricin), soit dans le suc de leurs fruits (orange), soit dans leurs feuilles (marronnier, belladone).

CHAPITRE III

ACTION TRANSFERANTE DES PREPARATIONS D'ORANGE ET DE POMME SUR DIVERS COMPOSES ALCOOLIQUES

Après avoir constaté que les préparations d'orange et de pomme étaient capables de transférer le radical orthophosphorique sur le méthanol, il nous a paru indiqué de rechercher si cette activité s'exerçait aussi, et dans quelle mesure, sur différents composés alcooliques : les uns étaient des alcools ne possédant aucune autre fonction, les autres, au contraire, contenaient une ou plusieurs fonctions non alcooliques associées.

Ces expériences ont été pratiquées en utilisant soit le phénylphosphate, soit le p.nitrophénylphosphate comme donateur. Conduites parallèlement avec les préparations d'orange et de pomme, elles nous permettront de comparer la spécificité des deux enzymes.

Les tableaux VII et VIII rassemblent les résultats de ces essais.

TABLEAU VII

TRANSFERT A PARTIR DU PHENYLPHOSPHATE AVEC LES PREPARATIONS D'ORANGE ET DE POMME

Accepteur	Concentration moléculaire de l'accepteur dans le milieu réactionnel	Préparation enzymatique d'orange			Préparation enzymatique de pomme		
		Durée de réaction en jours	Sc (*)	T (*)	Durée de réaction en jours	Sc (*)	T (*)
Méthanol	5,0	5	81	64	4	73	70
Ethanol	5,0	4	85	62			
N.propanol	2,5	4	28	50	4	16,5	31
Isopropanol	2,5	4	76,5	38	4	16	17
Ethylène-glycol	1,0	7	74	23	7	49	20
Glycérol	1,5	4	66	33	5	53	30
Butylène-glycol-2-3	1,0	4	87	10	4	20	10
Acide tartrique	0,5	4	77,5	4	4	19,5	12
Mannitol	1,0	2	55	27	3	36,5	31
Sorbitol	1,0	2	87	58	3	53	64
Volémitol	1,0	4	94	12	4	24	16
Saccharose	1,0	7	90	18	7	50,5	28
Inositol	0,5				5	38	0
Raffinose	0,125	7	84	0	7	37	0
Stachyose	0,125	7	82	0	7	34	0

Phénylphosphate 0,02 M : 2 ml - Tampon acétique pH 5,2 : 5 ml - Préparation enzymatique C ou P : 1 mg - Eau et accepteur pour obtenir un volume total de 10 ml - Durée de contact à 37° : variable -

(*) Sc : pourcentage du substrat scindé

T : pourcentage du phosphore transféré sur l'accepteur par rapport au substrat scindé.

TABLEAU VIII

TRANSFERT A PARTIR DU p.NITROPHENYLPHOSPHATE AVEC LES PREPARATIONS
D'ORANGE ET DE POMME

Accepteur	Concentra- tion molé- culaire de l'accepteur dans le mi- lieu réac- tionnel	Préparation enzymatique d'orange			Préparation enzymatique de pomme		
		Durée de réac- tion en jours	Sc (*)	T (*)	Durée de réac- tion en jours	Sc (*)	T (*)
Méthanol	5,0	2	93	74			
Ethylène-glycol	1,0	4	90	14			
Propylène-glycol	1,0	2	97	27	2	38	18
Glycérol	1,5	4	90	24			
Glycérol	4,0	4	100	62,5			
Choline	2,0	4	84	20	4	38	10
Glucose	2,0	1	47	19	1	14,5	22
Fructose	1,0	4	97	14			
Saccharose	1,0	4	100	7			
Inositol	0,5	4	100	0	4	45	0
Raffinose	0,125	6	100	0			
Stachyose	0,125	6	96	0			

p.nitrophénylphosphate 0,02 M : 2 ml - Tampon acétique pH 5,2 : 5 ml -
 Préparation enzymatique C ou P : 1 mg - Eau et accepteur pour un volume
 total de 10 ml - Durée de contact à 37° : variable.

(*) Sc : pourcentage du substrat scindé

T : pourcentage du phosphore transféré sur l'accepteur par rapport
 au substrat scindé.

DISCUSSION DES RESULTATS DES TABLEAUX VII ET VIII

A/- COMPARAISON ENTRE LES ENZYMES D'ORANGE ET DE POMME.-

Si l'on compare les résultats obtenus avec les deux préparations d'orange et de pomme, on constate que les activités de ces deux enzymes sont tout-à-fait voisines, tant au point de vue de la spécificité qu'à celui de l'intensité du pouvoir transférant.

Les mêmes composés alcooliques se révèlent des accepteurs possibles avec l'orange et avec la pomme. Parallèlement, les trois composés qui ne se sont pas comportés comme accepteurs ne l'ont été ni avec la pomme ni avec l'orange.

Si la préparation d'orange se montre le plus souvent d'une grande activité hydrolysante (la quantité de substrat scindé dans des conditions expérimentales identiques est parfois 4 à 5 fois supérieure), on observe des chiffres de transfert T très voisins.

On peut donc considérer les préparations enzymatiques d'orange et de pomme obtenues par la même méthode de précipitation acétonique comme tout-à-fait comparables en ce qui concerne l'activité transférante.

B/- DIFFERENTS COMPOSES ESSAYES COMME ACCEPTEURS.-

Les composés à fonction alcoolique expérimentés sont :

- a) Des mono ou polyalcools sans autres fonctions associées:
Méthanol, éthanol, propanol, éthylène-glycol, propylène-glycol, butylène-glycol, glycérol, mannitol, sorbitol, volémitol, mésoinositol.

- b) Des corps possédant une à plusieurs fonctions en plus de la ou des fonctions alcool : Tels sont l'acide tartrique, la choline; des oses : glucose, fructose; des oligoholosides : saccharose, raffinose, stachyose.

Parmi ces composés, quelques-uns avaient été signalés par AXELROD (4) comme susceptibles de jouer le rôle d'accepteur avec le p.nitrophénylphosphate comme donneur : ce sont le méthanol, le n.propanol, l'isopropanol, le propylène-glycol, le glycérol, le mannitol. Nos résultats confirment ceux de cet Auteur.

Par contre, celui-ci n'avait pas obtenu de transfert sur le saccharose : nous en avons obtenu un, discret à partir du p.nitrophénylphosphate, mais très net à partir du phénylphosphate, ceci avec les deux enzymes.

Nos essais ont, en outre, montré qu'un transfert était possible avec l'éthanol, l'éthylène-glycol, le butylène-glycol, l'acide tartrique, la choline, le glucose, le fructose, le mannitol, le sorbitol, le volémitol.

Le méthanol et l'éthanol apparaissent comme les meilleurs accepteurs : le transfert T atteint à partir du phénylphosphate, 64 pour le méthanol et 62 pour l'éthanol (enzyme d'orange), 70 pour le méthanol (enzyme de pomme) et à partir du p.nitrophénylphosphate 74 pour le méthanol (enzyme d'orange).

Le propanol et l'isopropanol, le glycérol, le sorbitol, le mannitol, permettent des transferts T atteignant respectivement 50, 38, 33, 58 et 31.

Viennent ensuite le saccharose (T = 28) le propylène-glycol (T = 27), l'éthylène-glycol (T = 23), le glucose (T = 19), la choline (T = 20), le fructose (T = 14), le volémitol (T = 16), l'acide tartrique (T = 12), le butylène-glycol (T = 10).

Si l'on cherche une relation entre la constitution chimique de l'accepteur et le transfert obtenu, on peut noter que les meilleurs accepteurs sont les alcools ne renfermant pas d'autres fonctions dans leur molécule : méthanol, éthanol, n.propanol, glycérol, mannitol, sorbitol, éthylène-glycol et propylène-glycol.

Comme AXELROD, nous constatons que les alcools primaires sont de meilleurs accepteurs que les alcools secondaires : dans des conditions identiques, le n.propanol permet un transfert T de 50 (avec l'orange) et de 31 (avec la pomme), tandis que l'isopropanol conduit aux valeurs respectives de T 38 et 17. AXELROD obtenait 60 avec le n.propanol et 31 avec l'isopropanol.

Les sucres donnent, d'une manière générale, des transferts plus réduits et ceci d'autant plus que l'on s'adresse à des corps de poids moléculaire plus élevé, pour arriver aux résultats négatifs constatés avec le raffinose et le stachyose. Ces deux oligoholosides se sont montrés incapables d'agir comme accepteurs, aussi bien à partir du phénylphosphate (orange ou pomme) qu'à partir du p.nitrophénylphosphate (orange).

AXELROD n'avait pu déceler aucun transfert sur le mésoinositol à partir du p.nitrophénylphosphate : nos essais confirment cette expérience. Aucun des deux enzymes n'a pu provoquer de transfert sur l'inositol, ni à partir du p.nitrophénylphosphate, ni à partir du phénylphosphate.

C/- INFLUENCE DE LA NATURE DU DONATEUR.-

Comme l'avaient montré les essais préliminaires, le transfert obtenu avec un accepteur donné, et un enzyme donné, à partir des deux substrats étudiés, est plus important à partir du p.nitrophénylphosphate. Si l'on note le temps d'incubation nécessaire pour obtenir des trans-

ferts voisins, ce temps est souvent avec le phénylphosphate de 1,5 à 2,5 fois celui observé avec le p.nitrophénylphosphate.

C'est ainsi que trois accepteurs, méthanol, éthylène-glycol et saccharose, expérimentés avec les deux substrats, toutes les autres conditions étant identiques, transfèrent des quantités comparables d'acide orthophosphorique en des temps de réaction notablement différents :

	<u>Phényl- phosphate</u>	<u>p.nitrophényl- phosphate</u>
avec le méthanol	5 jours	2 jours
avec l'éthylène-glycol	7 jours	4 jours
avec le saccharose	7 jours	4 jours

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Des essais de transfert ont été pratiqués à partir de deux substrats, le p.nitrophénylphosphate et le phénylphosphate, avec deux préparations enzymatiques d'orange et de pomme, sur quelques composés alcooliques.

Il apparaît nettement :

- 1) Que les préparations d'orange et de pomme ont la même spécificité et une activité transférante très voisine.
- 2) Que des deux donateurs essayés, phénylphosphate et p.nitrophénylphosphate, ce dernier se montre le plus actif.
- 3) Que les meilleurs accepteurs, parmi les corps étudiés, sont les alcools primaires, et en particulier les premiers de la série méthanol et éthanol. Le glycérol, le sorbitol, se montrent aussi de bons accepteurs, ce qui nous incitera, dans une autre partie de ce travail, à concrétiser ces essais en cherchant à isoler certains ^{synthétisés} corps par transfert : glycérophosphate et sorbitolphosphate.

CHAPITRE IV

ESSAIS DE TRANSFERT AVEC DES PRÉPARATIONS DE BELLADONE ET DE MOUTARDE BLANCHE

La phosphatase acide ayant été retrouvée dans la plupart des organes et tissus des végétaux supérieurs, nous nous sommes proposés, après avoir étudié l'activité transférante de sucs de fruits, de rechercher cette propriété dans des préparations de feuilles et de graines.

Les recherches de PRATESI (48) (49) (50) ont montré que toutes les feuilles étudiées renfermaient des phosphatases du type II. KHORSAND (36) a constaté que les feuilles de belladone, entre autres, étaient douées d'une bonne activité phosphatasique II et contenaient aussi une phosphatase du type III.

Les phosphatases de graines sont encore mieux connues : Elles ont été retrouvées dans toutes les espèces étudiées. Parmi celles-ci, la graine de moutarde blanche montre une forte activité phosphatasique COURTOIS et PEREZ (20).

A/- COMPARAISON DES ACTIVITES DES PREPARATIONS DE MOUTARDE, DE BELLADONE, D'ORANGE ET DE POMME.-

Dans une première expérience, nous avons tenté d'identifier une activité transférante des enzymes de la belladone et de la moutarde blanche, avec le phénylphosphate comme donateur de phosphate, et trois accepteurs

différents : méthanol, éthanol et glycérol.

Les quantités d'enzyme ajouté ont été choisies, après un essai sommaire, de façon à provoquer la scission de quantités voisines de donateur pour une même durée de réaction.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau IX :

TABLEAU IX

ACTION TRANSFERANTE COMPAREE DES PHOSPHATASES DE BELLADONE
ET DE MOUTARDE

Concentration de l'accepteur dans le milieu réactionnel			Méthanol 5 M		Ethanol 3 M		Glycérol 4 M	
			Sc(*)	T(*)	Sc	T	Sc	T
Durée de réaction en heures	1	Belladone	14,0	43	17,0	50	14,5	36
		Moutarde	15,5	1	15,0	9	16	12
	3	Belladone	23,0	51	28,0	60	22	40
		Moutarde	24,5	0	25,5	6	26	12

(*) Sc et T ont la même signification qu'aux tableaux précédents. Donateur : phénylphosphate 0,004 M dans le milieu pH 5,2 - 1 mg de préparation de belladone ou 0,1 mg de préparation de moutarde (préparation III) - Volume total 10 ml.

Avec chacun des trois accepteurs l'action transférante de la belladone est importante; au contraire, la moutarde ne provoque pratiquement aucun transfert sur le méthanol; avec l'éthanol et le glycérol le transfert est très inférieur à celui que l'on obtient avec les enzymes de belladone, d'orange ou de pomme.

Dans l'expérience suivante, l'enzyme de moutarde est comparé aux enzymes d'orange et de pomme, en utilisant cette fois le p.nitrophénylphosphate comme donateur et le glycérol comme accepteur. Les quantités d'enzyme introduites sont les mêmes pour les trois végétaux. Ce sont les durées de réaction qui ont été choisies de façon à produire des scissions assez marquées du donateur.

Les résultats de cette série d'essais forment la matière du tableau X :

TABLEAU X

ACTION TRANSFERANTE COMPAREE DES PREPARATIONS DE MOUTARDE,
D'ORANGE ET DE POMME

Nature de l'enzyme	Durée de la réaction (en heures)	Sc	T
Moutarde (préparation III)	3	59,5	7,5
Orange	48	39	48
Pomme	96	20	35
Donateur : p.nitrophénylphosphate 0,004 M dans le milieu - pH 5,2 - Enzyme 0,4 mg - Accepteur : glycérol 4 M - Volume total : 10 ml .			

Les préparations d'orange et de pomme provoquent un transfert important, tandis que celle de moutarde montre une activité transférante comparativement très faible.

La troisième expérience met en présence le phénylphosphate, l'éthanol, et chacun des trois enzymes de belladone, de moutarde et d'orange. La durée de réaction est la même pour les trois préparations, dont la quantité a été choisie pour provoquer une hydrolyse assez marquée.

Le tableau XI réunit les résultats de cet essai.

TABLEAU XI

ACTION TRANSFERANTE COMPAREE DES PREPARATIONS DE BELLADONE,
D'ORANGE ET DE MOUTARDE

Nature de l'enzyme	Poids d'enzyme en mg pour 10 ml de milieu	Sc	T
Belladone	1	44,5	65
Orange	1	20	50
Moutarde (préparation III)	0,1	51	17,5
Donateur : phénylphosphate 0,004 M - pH 5,2 - Accepteur : éthanol 3 M - Volume total : 10 ml - Durée de la réaction: 6 heures.			

Pour une concentration égale en accepteur et une égale durée de réaction, la belladone manifeste une activité nettement supérieure à celle de l'orange, tant au point de vue de l'hydrolyse qu'à celui du transfert. La

préparation de moutarde est plus purifiée et, de ce fait, plus active à poids égal; introduite en quantité dix fois moindre que les deux autres préparations enzymatiques elle provoque une hydrolyse plus importante mais, par contre, un transfert nettement inférieur.

Les trois expériences précédentes permettent ainsi de procéder à un classement des quatre enzymes étudiés jusqu'ici.

Les trois préparations de belladone, d'orange et de pomme ont été obtenues selon la même technique de précipitation acétonique à basse température : l'enzyme de belladone montre une activité hydrolysante et un pouvoir transférant nettement supérieurs à ceux des préparations similaires d'orange et de pomme.

La préparation III de moutarde, dont la purification a été plus poussée, manifeste une activité hydrolysante très supérieure à celle des trois autres préparations : elle provoque une hydrolyse comparable, à dose dix fois moindre ou en un temps beaucoup plus réduit. Par contre, son pouvoir transférant se montre beaucoup plus faible que celui des autres enzymes.

B/- ESSAIS EN VUE DE CHERCHER A PRECISER LES CAUSES DE LA MEDIOCRE ACTION TRANSFERANTE DE LA PREPARATION DE MOUTARDE.-

En vue d'interpréter les faibles transferts obtenus avec l'enzyme de moutarde, il était possible de formuler plusieurs hypothèses parmi lesquelles :

- 1) L'ester synthétisé par transfert est hydrolysé au fur et à mesure de sa formation.
- 2) L'enzyme est inactivé par l'accepteur.

- 3) La moutarde contient un effecteur spécifique de la réaction de transfert dont la purification l'a privée, ou un inhibiteur persistant ^{7 même} dans une préparation purifiée.
 - 4) Les activités hydrolysante et transférante sont dues à deux enzymes distincts.
- 1 - COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYSANTE DE LA MOUTARDE SUR LE PHENYLPHOSPHATE ET LE GLYCEROPHOSPHATE

Les composés synthétisés par l'action transférante des hydrolases sont à leur tour hydrolysables par les mêmes enzymes. Si cette hydrolyse est aisée, le transfert observable sera moins important. Au contraire, si le composé est lentement scindé le transfert paraîtra plus considérable.

Ainsi les hétérosides du méthanol sont scindés beaucoup plus lentement que les hétérosides des phénols utilisés comme donateurs : Le méthanol se comporte avec les glucidases comme un excellent accepteur. RABATE (51), COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et PETEK (18).

Nous avons cherché à déterminer si la préparation de moutarde d'une part, les préparations d'orange et de belladone d'autre part, se comportaient différemment au point de vue de leur action hydrolysante vis-à-vis des esters phosphoriques de phénols et d'alcools : des différences sensibles pourraient expliquer les divergences observées entre les actions transférantes de la moutarde et des autres préparations.

Le tableau XII réunit les résultats obtenus en hydrolysant avec les préparations de belladone, d'orange et de moutarde le p. nitrophénylphosphate, le phénylphosphate, l' α -glycérophosphate et le β -glycérophosphate. Les durées de réactions et les doses d'enzymes ont été choisies après des essais préliminaires, de façon à provoquer des

hydrolyses du même ordre de grandeur que celle du p.nitro-phénylphosphate choisi arbitrairement comme terme de comparaison.

TABLEAU XII

HYDROLYSE PHOSPHATASIQUE COMPAREE DE DIVERS ESTERS PHOSPHORIQUES

Origine, dose de l'enzyme et durée en heures	p.nitro-phényl-phosphate	phényl-phosphate	α glycérophosphate	β glycérophosphate	rapport p.nitro α glycérophosphate	rapport p.nitro β glycérophosphate	rapport phényl α glycérophosphate	rapport phényl β glycérophosphate
Orange 1 mg 24 heures	43	34	12,5	13,5	3,4	3,2	2,7	2,5
Belladone 1 mg 4,5 heures	31	16,5	6,6	5,5	4,7	5,6	2,5	3
Moutarde préparation III 0,1mg-2h.	30	27	13	15,5	2,3	1,9	2,0	1,75

Substrat 0,004 M dans le milieu - Dosage de l'acide orthophosphorique libéré à pH 5,2 et à 37° -

Les chiffres du tableau indiquent les pourcentages d'hydrolyse du substrat et les rapports entre ces pourcentages.

Avec les trois préparations enzymatiques l'hydrolyse des esters de phénols est plus rapide que celle des glycérophosphates, mais les différences sont nettement moins accentuées avec la préparation de moutarde.

Le rapport ester de phénol hydrolysé / glycérophosphate hydrolysé se situe entre 2,5 et 5,6 pour l'orange et la belladone, entre 1,75 et 2,3 pour la moutarde. Ce pouvoir hydrolysant plus intense de la moutarde sur les glycérophosphates peut être retenu comme une cause de diminution du transfert observable avec cette préparation, lorsque l'on a recours au glycérol comme accepteur.

Cependant cette différence d'action hydrolysante, si elle est nette, n'est pas très importante et ne peut suffire à expliquer, à elle seule, les divergences observées dans le transfert par les diverses phosphatases.

2 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE L'ACCEPTEUR SUR L'ACTION TRANSFÉRANTE DES DIVERSES PRÉPARATIONS.

Nous avons aussi recherché l'influence de la concentration de l'accepteur, introduit à doses assez importantes dans le milieu, sur l'action transférante des diverses préparations.

Cette étude a été faite en utilisant le glycérol comme accepteur, aux concentrations 0,5 - 1 - 2 et 4 M dans le milieu réactionnel. Les résultats en sont réunis dans le tableau XIII et la figure 7.

Le comportement de l'enzyme de moutarde apparaît tout différent de celui des préparations d'orange et de pomme.

TABLEAU XIII

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLYCEROL SUR LE TRANSFERT
DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE

Origine de l'enzyme	Durée de la réaction en heures	Concentration moléculaire en glycérol dans le milieu							
		0,5		1,0		2,0		4,0	
		Sc(*)	T(*)	Sc	T	Sc	T	Sc	T
Moutarde (préparation III)	3	88	7	88	14	75	7	59	7
Orange	48	37	8	41	12	39	33	39	48
Pomme	96	20	9	20	18	18	21	20	35

(*) Sc et T exprimés comme au tableau VII . 0,4 mg de préparation enzymatique - p.nitrophénylphosphate 0,004 M dans le milieu - pH 5,2 - 37° .

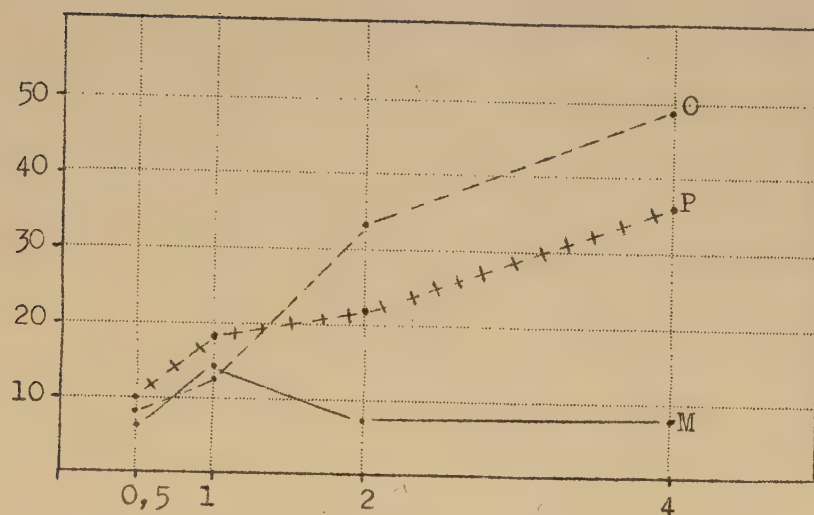
Au point de vue de l'hydrolyse, la vitesse à laquelle le p.nitrophénylphosphate est scindé par l'enzyme d'orange ou celui de pomme n'est pas influencée, dans les limites de cette expérience, par la concentration en glycérol. Avec la moutarde, au contraire, la vitesse est nettement diminuée au-dessus de la concentration 2 M en glycérol. Il convient de noter que la préparation de moutarde a été purifiée d'une façon plus poussée que les deux autres préparations, elle peut donc être plus aisément inactivable par des concentrations élevées en accepteur.

En ce qui concerne le transfert, exprimé par le pourcentage T de phosphore transféré par rapport au phosphore séparé du substrat, on constate avec les préparations d'orange et de pomme qu'il augmente régulièrement avec la concentration en accepteur. Cette propriété a du reste été maintes fois observée avec d'autres transférases; elle découle de la loi d'action de masse. C'est précisément sur ce point que la préparation de moutarde s'écarte des deux autres préparations : le transfert T augmente quand la concentration passe de 0,5 à 1 M, puis diminue pour la concentration 2 M et demeure identique pour la concentration 4 M. Ces deux dernières concentrations, nous l'avons vu, inhibaient la scission du substrat. Elles donnent des transferts T beaucoup plus faibles qu'avec les préparations d'orange et de pomme, tandis qu'aux concentrations 0,5 ou 1 M correspondent des transferts très voisins pour les trois préparations.

Tout semble donc se passer comme si la préparation de moutarde était inhibée par l'accepteur, ou plus sensible à cette inhibition que les deux autres préparations ; il est permis de supposer qu'un équilibre s'établit entre deux facteurs opposés : action de masse favorisant, augmentée par de fortes doses d'accepteur et action inhibitrice sur l'enzyme exercée par la concentration de cet accepteur. Dans le cas de la moutarde, cet équilibre serait rompu en faveur de l'action inhibitrice dominante.

FIGURE 7

Influence de la concentration en glycérol sur le transfert de l'acide orthophosphorique.



Abscisses : concentration moléculaire en glycérol dans le milieu.

Ordonnées : transfert pour cent de substrat scindé.

Courbe O : préparation d'orange.

Courbe P : préparation de pomme.

Courbe M : préparation de moutarde.

3 - ACTION TRANSFERANTE DES PREPARATIONS ASSOCIEES

Il était permis d'envisager que la purification de l'enzyme de moutarde (préparation III) l'a privé d'un effecteur spécifique de la réaction de transfert, tandis que les préparations de belladone, d'orange et de pomme, dont la purification a été moins poussée, contiennent cet

Les chiffres rassemblés dans le tableau XIV montrent :

- 1) Que les trois préparations de moutarde (extrait aqueux dont 0,5 ml correspond à 10 mg de poudre, préparation II moyennement purifiée et préparation III d'activité phosphatasique élevée) ont une action transférante également faible. La purification ne l'a pas modifiée de façon notable.
- 2) Que l'association moutarde-orange se traduit par une augmentation du pouvoir hydrolysant de l'orange, tandis qu'on observe avec l'association moutarde-belladone, soit une augmentation de l'activité phosphatasique de la belladone (préparation III), soit une diminution (préparation I et II).
- 3) Que le pouvoir transférant de chaque association a une valeur intermédiaire de celles observées pour les mêmes préparations réagissant séparément. Aucune d'elles ne semble donc renfermer soit un activateur énergétique, soit un puissant inhibiteur des réactions de transfert.

4 - HYPOTHESE DE DEUX ENZYMES DISTINCTS

Une quatrième hypothèse consisterait à supposer que les activités hydrolysante et transférante sont dues à deux enzymes distincts.

Il existe des arguments en faveur de l'identité des phosphotransférases avec les phosphomonoestérases : AXELROD (4), MORTON (44) (45) fondent cette hypothèse sur la constance du rapport des activités hydrolysante et transférante aux différents stades de la purification des phosphatases. DAVISON, REYNOLDS, BARRULKO et LEMON (23) sur le fait que les deux activités sont inhibées par les mêmes composés. Une preuve directe en a été fournie à l'aide de méthodes physico-chimiques, par LONDON et HUDSON (37).

Il faut cependant supposer que les préparations enzymatiques utilisées n'ont pas atteint un degré de purification tel qu'elles ne constituent encore un mélange complexe de plusieurs enzymes possédant, outre une ou plusieurs activités spécifiques communes, certaines activités distinctes que des méthodes de fractionnement appropriées eussent permis de séparer.

C'est ainsi qu'ANAGNOSTOPOULOS et LINO (2) ont pu mettre en évidence, dans la graine de seigle, à l'aide de fractionnements par le sulfate d'ammonium, deux enzymes possédant un pouvoir phosphatasique, mais doués en outre, l'un de l'activité transférasique, l'autre de l'activité phytasique de la préparation initiale. TUNIS et CHARGAFF (59), à partir de préparations partiellement purifiées de racine de carotte, ont séparé par adsorption et élution sur célite deux enzymes : l'un d'eux est doué d'une activité hydrolysante; l'autre, dont le pouvoir phosphatasique est extrêmement faible, possède, par contre, toute l'activité transférante spécifique sur les nucléosides de la préparation originelle. C'est la première fois qu'un enzyme transférant est séparé de l'enzyme hydrolysant.

Dans notre travail, toutes les préparations utilisées sont à un degré de purification inférieur à celui obtenu par ces Auteurs. Aussi ne sommes-nous en mesure ni de confirmer l'hypothèse de deux enzymes distincts, ni de l'éliminer a priori.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Des expériences destinées à expliquer la médiocre activité transférante de la phosphatase de graine de moutarde blanche, il y a lieu de retenir deux propriétés particulières à cet enzyme et qui interviennent dans le même sens.

- 1) Les vitesses d'hydrolyse des esters phosphoriques des phénols et des alcools sont nettement plus voisines avec la préparation de moutarde qu'avec les préparations de belladone et d'orange.
- 2) La préparation de moutarde montre une sensibilité plus grande à l'inhibition par de fortes concentrations d'accepteur.

Ainsi, aux propriétés générales des hydrolases, peuvent se superposer des propriétés particulières à la molécule protéinique : dans le cas de la préparation de graine de moutarde, elles interviennent dans un sens défavorable à l'activité transférasique.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA CINETIQUE DU TRANSFERT PAR LA PHOSPHATASE D'ORANGE

Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence des principaux facteurs qui interviennent dans les réactions de transfert. Ces essais, qui complètent ceux d'AXELROD (4) nous permettront, non seulement de préciser quelques points de la cinétique des transferts, mais aussi de déterminer quelles seront les conditions les plus favorables à réaliser pour obtenir le rendement maximum quand nous procéderons à l'isolement de l'ester synthétisé.

A/- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACCEPTEUR.-

L'étude comparative des préparations de moutarde, d'orange et de pomme nous a montré que, sauf en ce qui concerne le premier de ces trois enzymes, l'augmentation de la concentration en accepteur entraînait un accroissement de la valeur T du transfert. AXELROD (4) avait observé la même influence en utilisant le p.nitrophénylphosphate ou le phénylphosphate comme substrat, le méthanol comme accepteur et l'enzyme d'orange.

MORTON (44) avec la phosphatase alcaline du lait de vache et celle de la muqueuse intestinale de veau, notait une augmentation du transfert sur le glucose par l'accroissement de la concentration en accepteur jusqu'à

une certaine valeur, puis un palier. Les mêmes observations étaient faites avec le fructose et le glycérol.

ANAGNOSTOPOULOS et LINO (2) avec des phosphatases de graines et le méthanol comme accepteur, observent dans tous les cas une augmentation de la valeur du transfert T quand la concentration en méthanol s'accroît. Les quantités absolues de méthylphosphate formé, suivant les graines étudiées, n'accusent pas toujours une augmentation parallèle, par suite de l'inhibition exercée spécifiquement par le méthanol sur la scission du donateur.

B/- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DONATEUR.-

L'influence de la concentration en donateur a été étudiée avec le p.nitrophénylphosphate aux concentrations 0,004 M - 0,01 M et 0,025 M et le glycérol comme accepteur à la concentration unique 4 M.

Le même essai a été pratiqué avec deux concentrations d'enzyme.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau XV.

Ils montrent que, pour une dose d'enzyme de 1 mg dans 10 ml de milieu réactionnel, le transfert T diminue de façon très appréciable quand la concentration du substrat augmente.

Pour une concentration 0,004 M en p.nitrophénylphosphate, le transfert atteint 53. Pour la concentration 0,01 M il s'abaisse à 43 et à 28 pour la concentration 0,025 M. Si l'on considère non plus les pourcentages mais les vitesses d'hydrolyse et de transfert exprimées par les quantités absolues de substrat scindé ou transféré dans l'unité de temps, on constate que, si l'augmentation de la concentration en donateur entraîne une accélération de

TABLEAU XV

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DONATEUR SUR LE TRANSFERT

Concentration en substrat dans le milieu	Durée de la réaction en heures	Enzyme 1 mg pour 10 ml de milieu				Durée de la réaction en heures	Enzyme 10 mg pour 10 ml de milieu	
		Sc	Vs	T	Vt		Sc	T
0,004 M	24	48,5	0,19	53	0,10	1	21,5	39
0,01 M	24	16	0,26	43	0,11	4	33	51
0,025 M	24	13,8	0,34	28	0,10	8	23,5	55
Donateur : p.nitrophénylphosphate - Accepteur : glycérol 4 M dans le milieu - Enzyme d'orange - pH 5,2 - Température : 37° - Vs et Vt expriment les vitesses de scission du donateur et de transfert.								

L'hydrolyse, elle est sans influence sur la vitesse de transfert. Ces résultats sont à rapprocher de ceux que MORTON (44) a obtenus avec la phosphatase alcaline du lait de vache et de la muqueuse intestinale de veau. Cet Auteur, utilisant le créatine-phosphate comme donateur et le glucose comme accepteur, n'a pas observé d'influence de la concentration en substrat sur le pourcentage de transfert. L'augmentation de cette concentration entraîne par contre un accroissement des vitesses de scission du donateur et de transfert.

Ces différences peuvent trouver une explication si l'on tient compte d'une observation de GREEN et MEYERHOF (28), d'après laquelle le p.nitrophénol libéré quand le substrat est le p.nitrophénylphosphate, exerce une nette inhibition sur l'hydrolyse par la phosphatase alcaline de l'intestin et, à un moindre degré, par la phosphatase acide du

sperme. Ces inhibitions sont d'autant plus importantes que la concentration en p.nitrophénol dans le milieu est plus grande.

TABLEAU XVI

EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN DONATEUR

	Phosphatase acide (p.nitrophénylphosphate)	Phosphatase alcaline (créatine-phosphate MORTON)
Sur la vitesse d'hydrolyse	augmentation	augmentation
Sur la vitesse de transfert	0	augmentation
Sur le pourcen- tage de trans- fert	diminution	0

Nous avons vérifié, par une série d'essais pratiqués avec les enzymes de belladone, d'orange et de pomme, que le p.nitrophénol inhibait l'hydrolyse du glycérophosphate de sodium.

Pour chaque préparation enzymatique, l'hydrolyse du glycérophosphate à la concentration 0,004 M était réalisée en présence de concentrations en p.nitrophénol égales à 0,002 - 0,004 - 0,02 et 0,04 M. Les durées de réac-

tion retenues étaient celles qui donnaient des pourcentages d'hydrolyse voisins pour les trois enzymes.

Il a été vérifié que, même à la concentration 0,04 M, le nitrophénol ne perturbe pas le dosage de l'acide orthophosphorique par la méthode de BRIGGS.

Le tableau XVII réunit les résultats de cette expérience.

TABEAU XVII

INHIBITION DE L'HYDROLYSE DU GLYCEROPHOSPHATE DE SODIUM
PAR LE p.NITROPHENOL

Origine de l'enzyme	Durée en heures	Sans p.nitro-phénol	Concentration dans le milieu du p.nitrophénol ajouté			
			0,002 M	0,004 M	0,02 M	0,04 M
Belladone	12	17,5	16,5	16	13,5	10,5
	22	22,5	21,5	20,8	17,5	13,5
Orange	48	28	25,5	25	22	18,5
Pomme	96	18,5	18,5	18	17	15

Substrat : β .glycérophosphate de sodium 0,004 M préalablement ajusté à pH 5,2 - Enzyme : 1 mg - Tampon acétique pH 5,2 - Température 37° - Les chiffres exprimés indiquent l'acide orthophosphorique libéré pour cent de la quantité mise en oeuvre sous forme de glycérophosphate.

Les chiffres du tableau XVII montrent que, pour les trois enzymes, la diminution du pourcentage d'hydrolyse, négligeable pour la concentration 0,002 M en nitrophénol, devient plus appréciable pour la concentration 0,004 M et très sensible pour les concentrations supérieures.

Ces expériences, en confirmant l'observation de GREEN et MEYERHOF selon laquelle le p.nitrophénol inhibe le pouvoir hydrolysant de la phosphatase, nous permettent de supposer qu'il intervient dans le même sens vis-à-vis de son activité transférante.

Si l'on se reporte au tableau XVII, on peut calculer qu'une inhibition de 33 p.100 est obtenue avec l'enzyme d'orange, pour une concentration en p.nitrophénol égale à 0,04 M. Elle n'est plus que de 10 p.100 pour une concentration en p.nitrophénol égale à 0,004 M.

D'autre part, le tableau XV indique une hydrolyse du substrat égale à 13,8 p.100 quand il est introduit à la concentration 0,025 M, la plus forte utilisée dans cette expérience, et par suite, une concentration en p.nitrophénol de 0,0034 M. Une telle concentration provoquera donc une inhibition de l'hydrolyse de l'ordre de 10 p.100.

Cette influence n'est pas négligeable et permet d'attribuer dans une certaine mesure à l'augmentation de la concentration en substrat, par l'accroissement de la concentration en p.nitrophénol qui en résulte, la diminution du pourcentage de l'hydrolyse et du transfert.

Il n'est pas exclu toutefois que cette inhibition soit provoquée pour une certaine part, par le p.nitrophénylphosphate lui-même.

Le tableau XV montre aussi que si l'on augmente notablement la dose d'enzyme (10 mg au lieu de 1 mg dans 10 ml de milieu) on n'observe plus cette diminution de transfert par accroissement de la concentration en substrat.

Les durées d'incubation retenues étant celles qui, pour les trois concentrations en donateur, permettent d'obtenir des pourcentages d'hydrolyse voisins, les transferts ont respectivement les valeurs 39, 51 et 55.

Ces résultats sont en accord avec ce qui précède : si l'augmentation de la concentration en substrat exerce une action inhibitrice sur l'enzyme, et à la condition que cette inhibition soit modérée, la présence de quantités supérieures d'enzyme doit atténuer et même supprimer cette influence.

C/- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME.-

L'étude de l'influence de la quantité d'enzyme mise en oeuvre sur le transfert T, a été réalisée dans deux expériences : dans la première, le p.nitrophénylphosphate est utilisé à la concentration 0,004 M, le glycérol accepteur à la concentration unique 4 M et l'enzyme à trois concentrations différentes : 0,4 - 1 et 10 mg pour 10 ml de milieu réactionnel.

Dans la deuxième expérience le substrat est employé à la concentration 0,025 M, le glycérol à la concentration unique 4 M et l'enzyme aux concentrations de 1 et 10 mg pour 10 ml de milieu réactionnel.

Les durées de réaction retenues ont été celles qui donnaient des hydrolyses de valeurs voisines.

Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau XVIII.

Les chiffres de ce tableau montrent que si l'on opère en présence du substrat à la concentration 0,004 M, l'augmentation de la quantité d'enzyme n'a pas d'influence appréciable sur le pourcentage du transfert par rapport au substrat scindé.

TABLEAU XVIIIINFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR LE TRANSFERT

Poids d'enzyme en mg pour 10 ml de milieu	Substrat 0,004 M			Substrat 0,025 M		
	Durée en heures	Sc	T	Durée en heures	Sc	T
0,4	24	27	53			
1	12	30	51	72	29	36
10	2	40	50,5	8	23,5	55
Donateur : p.nitrophénylphosphate - Accepteur : glycérol 4 M dans le milieu - Enzyme d'orange - pH 5,2 - Tempéra- ture 37° -						

Il n'en est plus de même si l'on introduit le substrat à une forte concentration (0,025 M) : dans ces conditions, l'augmentation de la concentration en enzyme se traduit par un accroissement notable du transfert : en réalité la présence d'une quantité importante d'enzyme a diminué l'inhibition produite par une forte concentration en substrat.

D/- INFLUENCE DE LA DUREE DE REACTION.-

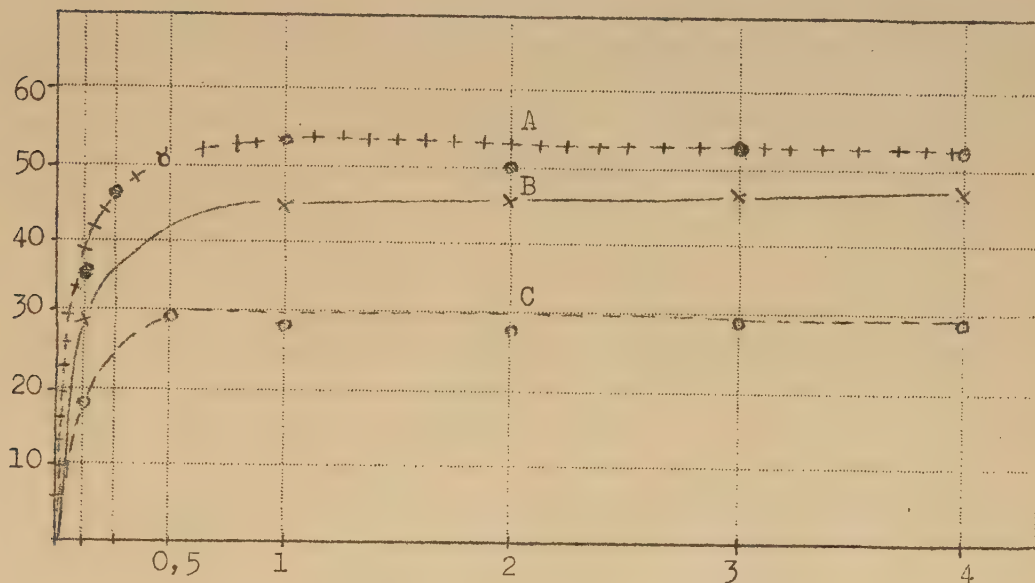
L'influence de la durée de réaction sur le transfert a été étudiée dans deux séries d'expériences : la première avec trois concentrations distinctes en substrat et

des quantités fixes d'accepteur et d'enzyme, la seconde avec trois concentrations différentes en enzyme et des quantités fixes d'accepteur et de substrat.

La figure 8 groupe les résultats obtenus dans la première série d'essais.

FIGURE 8

Transfert en fonction de la durée de réaction pour trois concentrations de donateur.



Abscisses : durée de la réaction en jours.

Ordonnées : pourcentage T du phosphate transféré sur le glycérol 4 M dans le milieu, par rapport au phosphate déplacé du donateur (p.nitrophényl-phosphate).

Préparation d'orange 1 mg. Volume total 10 ml.

Courbe A : donateur 0,004 M dans le milieu.

Courbe B : donateur 0,01 M " " "

Courbe C : donateur 0,025 M " " "

Les trois courbes représentant le transfert en fonction du temps pour trois concentrations en substrat, juxtaposées, présentent la même allure générale : dans une première phase le transfert T augmente rapidement, puis il reste stable. Le palier a une position différente pour chaque concentration en substrat, les valeurs de T étant d'autant plus grandes que la concentration est plus faible.

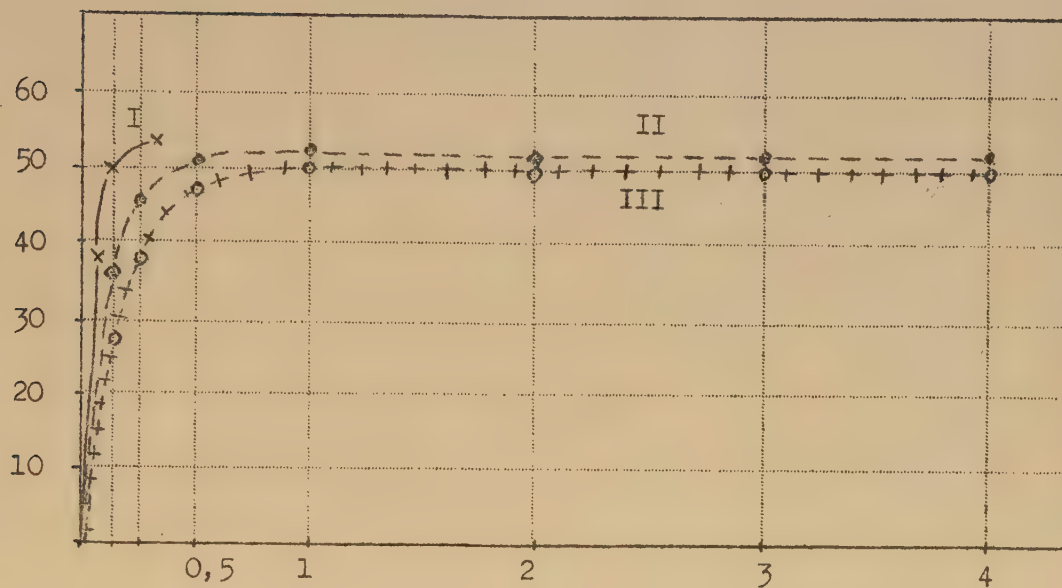
La forme de la courbe, entre son origine et le début de la partie horizontale, indique bien que la préparation enzymatique utilisée ne renferme pas d'activateurs du transfert tels que les dérivés phosphorés riches en énergie signalés par GREEN et MEYERHOF (28) qui accroissent le transfert dès le départ de la réaction et dont l'influence décroît rapidement. Il est permis de supposer que la partie horizontale de la courbe correspond à un équilibre établi entre la vitesse de la réaction sur le substrat et la vitesse d'hydrolyse de l'ester synthétisé par le même enzyme.

La figure 9 réunit les résultats de la deuxième série d'essais : ils indiquent les valeurs du transfert T en fonction du temps, mais pour trois concentrations différentes en enzyme.

Les trois courbes présentent un tracé analogue, mais la phase initiale est d'autant plus courte que la concentration en enzyme est plus élevée. Les valeurs prises par T dans la partie horizontale des trois courbes sont sensiblement égales.

FIGURE 9

Transfert en fonction de la durée de réaction pour trois concentrations d'enzyme.



Abscisses : durée de la réaction en jours.

Ordonnées : pourcentage T du phosphate transféré sur le glycérol 4 M dans le milieu, par rapport au phosphate déplacé du donateur (p.nitrophénylphosphate 0,004 M).

Enzyme d'orange :

Courbe I : 10 mg.

Courbe II : 1 mg.

Courbe III: 0,4 mg.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Les essais qui précèdent montrent que le transfert T sera d'autant plus important :

- 1) Que l'accepteur se trouvera à une concentration plus élevée.
- 2) Que la concentration du substrat sera plus faible, dans le cas où l'enzyme sera lui-même utilisé en quantité modérée.

Cependant, pour obtenir un meilleur rendement en vue de l'isolement de l'ester synthétisé, il y aura avantage à opérer à partir de fortes concentrations de donneur à la condition d'introduire l'enzyme à dose élevée.

De plus, les valeurs de T se maintenant fixes en fonction du temps, il y aura intérêt à poursuivre la réaction jusqu'à hydrolyse quasi complète du substrat. Cette façon de procéder présente, en outre, l'avantage de ne laisser subsister, dans le mélange réactionnel, à la fin de la réaction, que des traces du donneur, qu'il sera plus facile d'éliminer lors de l'isolement de l'ester.

DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT D'ESTERS FORMES PAR TRANSFERT ENZYMATIQUE DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE

INTRODUCTION

Dans la première partie de notre exposé, nous avons étudié l'action transférante exercée par un certain nombre d'extraits purifiés de divers végétaux sur plusieurs esters phosphoriques en présence d'alcools choisis comme accepteurs. L'action transférante était alors évaluée d'après des déterminations analytiques. A une époque donnée, le nombre de molécules de l'ester ayant pris naissance par transfert correspondait à la différence entre le nombre de molécules de phénol libérées à partir du donateur et le nombre de molécules d'orthophosphate libre se trouvant dans le milieu.

Il nous a paru utile de confirmer la réalité du transfert en isolant l'ester synthétisé. AXELROD (4) avait

bien déjà isolé le méthylphosphate issu d'un transfert à partir du p.nitrophénylphosphate sous l'influence d'un extrait purifié d'orange. Mais dans ce cas, l'accepteur était un monoalcool, le méthanol. Nous avons effectué l'isolement de deux esters obtenus en utilisant deux polyols différents comme accepteurs : le glycérol et le sorbitol. L'analyse de ces corps nous permettra aussi de savoir si le transfert s'est effectué sur une fonction alcool primaire ou sur une fonction alcool secondaire.

La fixation préférentielle du radical phosphoré sur la fonction alcool primaire est, en effet, une règle générale, quel que soit le processus de la phosphorylation.

La synthèse du glycérophosphate par réversibilité d'action donne une proportion d'isomère α dans le produit isolé du milieu réactionnel atteignant 50 pour 100 avec la taka-diastrase SUZUKI et MARUYANA (56), et la prostate, OHLMEYER (46), mais dépassant 80 pour 100 pour la plupart des auteurs : 85 pour 100 avec le duodénum, KAY et LEE (35), RAE, KAY et KING (52), 80 pour 100 au minimum avec le rein, COURTOIS (15) et même près de 100 pour 100 avec l'amande, COURTOIS (17), l'intestin et la prostate, MEYERHOF et GREEN (41).

L'estérification préférentielle de la fonction alcool primaire a été confirmée indirectement par l'expérience suivante : l'enzyme est mis en présence d'un mélange ester phosphorique-orthophosphate-glycérol de même composition que celui obtenu à l'équilibre par le même enzyme réagissant sur le mélange glycérol-orthophosphate. Le contact avec l'enzyme n'entraîne aucune modification du rapport ester phosphorique/orthophosphate. Si l'ester introduit est de l' α -glycérophosphate, il est retrouvé intact. Si, au contraire, le phosphore estérifié introduit est représenté par du β -glycérophosphate, le corps isolé après

action de l'enzyme renferme une forte proportion d' α -glycérophosphate. Tout se passe comme si l'enzyme, après avoir hydrolysé le β -glycérophosphate, resynthétisait une quantité équivalente de son isomère α . Cette transformation a été observée par COURTOIS avec les phosphatases du rein (15) et des amandes (17) et retrouvée par MEYERHOF et GREEN avec la phosphatase intestinale (41). Supposant qu'une telle transposition pouvait être attribuée à une mutase des glycérophosphates, COURTOIS et BIGET (19) en ont pratiqué la recherche. Ils n'ont pu la mettre en évidence dans aucune des préparations enzymatiques étudiées.

C'est l' α -glycérophosphate qui est obtenu par action de l'ATP sur le glycérol en présence de la glycérokinase de BUBLITZ et KENNEDY (13) ou dans les phosphorylations oxydatives par la pulpe de rein, KALCKAR (31) (32).

D'une façon plus générale, les hydrolases paraissent transférer sur des fonctions alcool primaire plutôt que sur des fonctions alcool secondaire; c'est ce qu'on observe par exemple avec l' α -galactosidase des graines de café, ANAGNOSTOPOULOS, COURTOIS et PETEK (1).

En ce qui concerne les réactions transférantes des phosphatases, le glycérol a été souvent utilisé comme accepteur. Pourtant, à notre connaissance, la nature du glycérophosphate synthétisé n'a pas été précisée. MORTON (44) signale seulement qu'il est probable que les phosphatases alcalines du lait et de la muqueuse intestinale forment, par transfert de l' α -glycérophosphate.

La préparation par voie enzymatique et l'isolement d'un glycérophosphate et d'un sorbitolphosphate, leur analyse en vue de déterminer leur constitution et, en particulier, la position du radical phosphoré, font l'objet de cette deuxième partie de notre travail.

CHAPITRE I

SYNTHESE ET ISOLEMENT D'UN GLYCEROPHOSPHATE

A/- REACTION ENZYMATIQUE.-

Principe

Le donateur choisi est le p.nitrophénylphosphate. Il est mis en présence de glycérol et d'un extrait purifié de feuilles de belladone dans des conditions choisies d'après les expériences relatées dans la première partie de notre exposé et telles que la proportion d'orthophosphate transféré soit maxima, à savoir :

Substrat à la concentration	0,025 M
Accepteur à la concentration	4 M
Préparation enzymatique	1 gr pour 1 litre

Technique

Dans un ballon de 5 litres sont introduits successivement :

{ Glycérol	736 gr
{ Tampon acétique M à pH 5,2	200 ml

le mélange est porté au bain-marie à 60° jusqu'à ce que sa température atteigne 40° environ. On lui ajoute alors :

{ Solution de p.nitrophénylphosphate	
{ M/15 ajustée à pH 5,2	750 ml

La solution obtenue est portée à nouveau au bain-marie à 60° jusqu'à ce que sa température atteigne 38° environ. Elle est alors additionnée de :

- (Suspension de 2 gr de préparation partiellement purifiée
- (de feuilles de belladone dans 100 ml d'eau distillée
- (Eau distillée q s pour 2.000 ml

Le mélange réactionnel est ensuite porté à l'étuve à 37° .

La marche de la réaction est suivie en dosant le p.nitrophénol libéré suivant la technique indiquée dans la première partie de notre travail. Il est, en effet, évident que, lorsque tout le p.nitrophénol a été libéré, la réaction est terminée. Le tableau XIX montre qu'au bout de 7 à 8 heures la réaction devient très lente et peut être considérée comme achevée.

TABLEAU XIX

Libération du p.nitrophénol au cours de la réaction

<u>Temps</u> (en heures)	<u>p.nitrophénol libéré</u> (en pourcentages)
1,5	24,8
2,0	38,0
4,0	78,4
5,0	83,7
6,0	94,8
7,0	96,2

Au bout de 7 heures, le bilan de la réaction s'établit comme suit : 37,6 pour 100 de l'orthophosphate préalablement estérifié à l'état de p.nitrophénylphosphate est libéré. Etant donné qu'alors 96,2 pour 100 du p.nitrophénol a été libéré, il s'en suit que 58,6 pour 100 de l'orthophosphate mis en jeu a été transféré sur le glycérol à l'état de glycérophosphate, tandis que 4 pour 100 environ du p.nitrophénylphosphate initial demeure dans la liqueur.

B/- ISOLEMENT DE L'ESTER PHOSPHORIQUE FORME PAR TRANSFERT.-

a) Principe

Il s'agit d'isoler le glycérophosphate présent dans une liqueur renfermant en outre du p.nitrophénol, du glycérol en quantité relativement très grande, de l'orthophosphate libre et une petite quantité de p.nitrophénylphosphate.

L'orthophosphate libre est éliminé après transformation à pH 8,5 en phosphate tribarytique insoluble.

Le glycérophosphate est ensuite isolé à l'état de sel neutre de baryum insoluble en milieu fortement alcoolique. La présence dans le milieu d'une forte proportion de glycérol gêne beaucoup la précipitation alcoolique, déjà pénible, du glycérophosphate de baryum à partir de ses solutions aqueuses. Celle-ci ne reste possible qu'en éliminant la majeure partie de l'eau présente dans la liqueur en concentrant celle-ci au bain-marie bouillant sous pression réduite. L'addition d'éthanol au résidu sirupeux obtenu permet alors de précipiter la majeure partie du glycérophosphate de baryum.

Au cours du séjour de la liqueur au bain-marie bouillant le p.nitrophénylphosphate présent est hydrolysé

car il est instable à pH 8,0 DESJOBERT (*), alors que le glycérophosphate, stable au-delà de pH 8,0, reste inaltéré.

Enfin, le p.nitrophénol étant soluble dans l'éthanol reste en solution lors de la précipitation du glycérophosphate de baryum.

b) Technique

Le mélange réactionnel est porté au bain-marie bouillant pendant 30 minutes pour inactiver l'enzyme. La liqueur est ensuite refroidie sous courant d'eau, puis filtrée sur talc au büchner. Le filtre est lavé à l'aide d'eau distillée jusqu'à ce que le filtrat soit à peu près incolore. Ce résultat n'est atteint que lorsque la presque totalité du p.nitrophénol adsorbé sur le filtre a été entraîné. On peut, en effet, admettre qu'alors la quasi-totalité de l'ester est passée dans le filtrat.

La liqueur est ensuite additionnée d'une solution aqueuse à 20 gr d'acétate de baryum (sel cristallisé à 2 OH_2 du commerce) pour 100 ml, en quantité calculée pour la transformation de tout l'orthophosphate libre en phosphate tribarytique et du glycérophosphate synthétisé en sel de baryum, puis de 10 ml environ d'une solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 pour 100. Le pH final est ajusté à 8,5 par addition de lessive de soude jusqu'à coloration rouge (environ 12 ml). Il apparaît un précipité qui est filtré sur talc comme précédemment.

La nouvelle solution obtenue, formée par la réunion du nouveau filtrat et des eaux de lavage, est concentrée au bain-marie bouillant sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse. Le volume du produit résiduel est

(*) DESJOBERT A., mémoire en cours de rédaction.

d'environ 600 ml. Après refroidissement, il est additionné de 3 litres d'éthanol à 90 pour 100 et de lessive de soude goutte à goutte, de manière à obtenir un pH de la liqueur égal à 8,0 (environ 1 ml). Il apparaît un léger précipité floconneux qui, au bout de 12 heures de repos, est déposé au fond du ballon. La liqueur surnageante limpide est décantée et rejetée, puis le reliquat est soumis à une centrifugation de 15 minutes à la vitesse de 3.000 tours/mi-nute.

Après la centrifugation, le liquide surnageant est rejeté. Le précipité rassemblé au fond du pot à centrifuger retient une petite quantité de glycérol. Il est alors remis en suspension dans 200 ml d'éthanol à 90 pour 100, puis recueilli sur un büchner de petit diamètre et lavé à l'aide d'éthanol à 90 pour 100, puis d'éther, enfin desséché sous vide sulfurique. Il a été ainsi recueilli 5,4 gr d'un produit légèrement brunâtre.

C/- PURIFICATION.-

Le produit brut est dissout par agitation mécanique en présence de billes de verre dans 750 ml d'eau distillée renfermant 2 ml d'acide chlorhydrique pur. La solution opalescente obtenue est filtrée sur talc. Le filtrat et les eaux de lavage (environ 50 ml) réunies forment une liqueur jaune limpide, cette coloration étant due à la présence d'une petite quantité de p.nitrophénol. Cette liqueur est additionnée de quelques gouttes de solution alcoolique de phénolphthaléine, puis de lessive de soude, jusqu'à début de virage, soit pH 8,0 environ. Il apparaît un très léger précipité floconneux constitué par une petite quantité d'orthophosphate tribarytique insoluble à pH 8,0 provenant de l'hydrolyse du p.nitrophénylphosphate signalée précédem-

ment. La liqueur est alors filtrée sur talc au büchner, le filtre étant lavé à l'aide de 50 ml d'eau distillée.

La nouvelle liqueur obtenue (filtrat + eaux de lavage) est filtrée au büchner sur charbon activé, ce qui permet d'éliminer les traces résiduelles de p.nitrophénol et de p.nitrophénylphosphate s'il en existe. Finalement, on obtient une solution absolument limpide et incolore dont on ajuste le pH très exactement à 7,5 en utilisant un électroHmètre à électrode de verre. Cette solution est additionnée d'un égal volume d'éthanol à 90 pour 100, soit 1 litre environ.

Après 12 heures de repos, le précipité formé est recueilli sur büchner, lavé à l'aide d'éthanol à 60 pour 100, puis d'éthanol à 90 pour 100 et enfin d'éther. Il est alors desséché sous vide sulfurique jusqu'à poids constant et enfin abandonné à l'air libre à nouveau jusqu'à poids constant.

D/- CONSTITUTION DU PRODUIT OBTENU.-

Le produit blanc obtenu après purification pèse environ 3,8 gr. Il a été soumis aux déterminations analytiques suivantes :

a) Dosage du phosphore

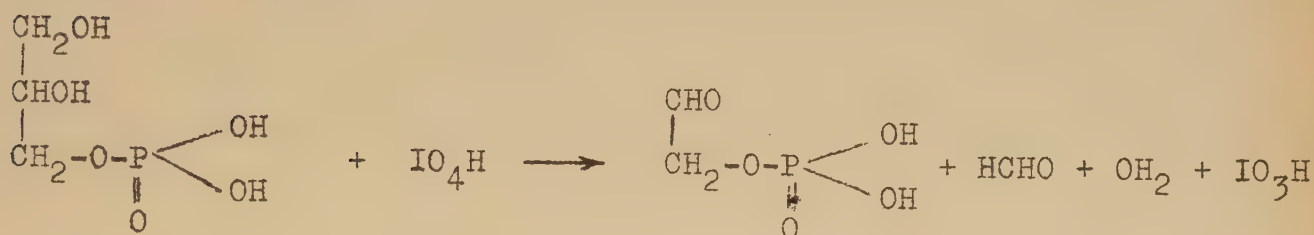
Le produit obtenu a été minéralisé par destruction nitrocuivrique selon THIVOLLE (57), puis le phosphore a été dosé par la méthode de COPAUX (14).

b) Dosage du baryum

Ce dosage a été effectué selon le protocole déjà décrit par JOSEPH (30).

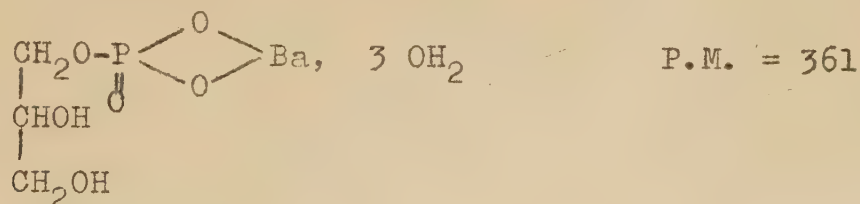
c) Action de l'acide periodique

Le glycérophosphate obtenu pouvait être l'ester phosphorique d'une fonction alcool primaire du glycérol, c'est-à-dire un α -glycérophosphate, ou l'ester phosphorique de la fonction alcool secondaire du glycérol, c'est-à-dire un β -glycérophosphate, ou encore un mélange des 2 isomères α et β . C'est pour lever ces incertitudes que nous avons eu recours à l'essai de l'oxydation par l'acide periodique. En effet, cet oxydant, à la température ordinaire, oxyde très rapidement l' α -glycérophosphate qui possède 2 fonctions alcool contigües, alors que dans les mêmes conditions le β -glycérophosphate est inattaqué. L'oxydation de l' α -glycérophosphate s'effectue selon la réaction de FLEURY et PARIS (25) :



Une molécule d' α -glycérophosphate est oxydée par une molécule de IO_4H en donnant une molécule de diosephosphate et une molécule de formaldéhyde.

Les résultats des déterminations analytiques montrent que le produit obtenu par transfert est l' α -glycérophosphate exempt d'isomère β , isolé à l'état de sel de baryum, correspondant à la formule :



Analyse

P pour 100 calculé : 8,58 ; trouvé : 8,28

Ba pour 100 calculé : 37,94 ; trouvé : 37,85

P/Ba calculé : 1,00 ; trouvé : 0,96

Molécules de IO_4H consommées par atome de P calculé : 1,00
trouvé : 1,01

Fonctions aldéhydiques par atome de P après oxydation périodique : calculé : 2,00
trouvé : 1,90

Le rendement final en ester transféré a été dans les conditions de notre travail, d'environ 20 pour 100, ce rendement étant évalué par rapport au P estérifié mis en jeu dans la réaction de transfert.

E/- DISCUSSION DE LA NATURE DU CORPS OBTENU PAR TRANSFERT.-

Bien que les déterminations analytiques effectuées sur l'ester phosphorique isolé nous aient montré de façon absolument nette qu'il s'agit d' α -glycérophosphate, il nous a semblé cependant qu'une incertitude pouvait subsister sur la nature du corps réellement présent dans le milieu réactionnel à la suite du transfert. Il ne nous paraît, en effet, possible d'affirmer que ce corps est l' α -glycérophosphate, que dans la mesure où il est vérifié qu'une quantité notable de β -glycérophosphate éventuellement présent dans le milieu réactionnel n'aurait pu échapper à l'isolement. Il faut également considérer que le β -glycérophosphate issu de la réaction à supposer qu'il ait existé, aurait pu se transposer en isomère α au cours des opérations effectuées. Nous noterons cependant que cette transposition du β -glycérophosphate était très improbable, toutes les opérations ayant été conduites en milieu alcalin.

Or, Mademoiselle BAILLY (7) a montré que la transformation du β -glycérophosphate en α -glycérophosphate jusqu'à un équilibre correspondant à 87,5 pour 100 de l'isomère α , valeur confirmée par FLEURY et LE DIZET (26), ne se réalisait qu'à un pH inférieur à 3,0.

a) Possibilité d'isomérisation de l'éventuel β -glycérophosphate initialement présent.

Afin de rechercher si l'isomérisation du β -glycérophosphate avait pu se produire au cours de l'isolement, nous avons reconstitué une liqueur de composition sensiblement identique à celle du mélange réactionnel, tel qu'il se présente à la fin de la réaction, moins la préparation enzymatique.

L'ester provenant du transfert a été remplacé par une quantité équivalente de β -glycérophosphate.

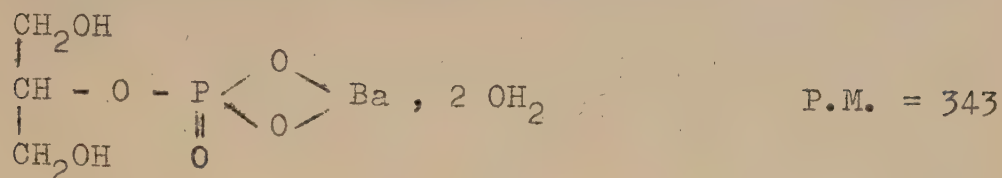
La composition de la liqueur ainsi reconstituée s'établit donc de la manière suivante :

(p.nitrophénylphosphate M/15	37 ml
{ p.nitrophénol	6 gr 6
{ phosphate disodique cristallisé à 12 OH ₂	
{ (P.M. = 358)	6 gr 3
{ β -glycérophosphate de sodium à 5 OH ₂ (P.M. = 306)	9 gr 3
{ glycérol	585 ml
{ tampon acétique M à pH 5,2	200 ml
{ eau distillée q.s. p.	2000 ml

L'isolement, la purification de l'ester ainsi que les déterminations analytiques ont été conduits exactement comme nous l'avons indiqué précédemment pour le corps issu du transfert.

Nous avons obtenu 6,5 gr de β -glycérophosphate de baryum, soit avec un rendement de 60 pour 100 de la théorie

et correspondant à la formule suivante :



Analyse

P pour 100	calculé : 9,03 ;	trouvé : 8,92
Ba pour 100	calculé : 39,94 ;	trouvé : 40,25
P/Ba	calculé : 1,00 ;	trouvé : 0,98

Molécules de IO_4H consommées par atome de P théorie : 0,0
trouvé : 0,0

- b) Possibilité de perte, au cours de l'isolement, du β -glycérophosphate éventuellement issu de la réaction enzymatique.

Dans une deuxième opération, le β -glycérophosphate a été remplacé par un mélange équivalent des deux isomères α et β , 75 pour 100 du phosphore estérifié total appartenant à l' α -glycérophosphate et 25 pour 100 au β -glycérophosphate.

Nous avons opéré exactement de la même façon que dans le cas de l'expérience précédente. La seule différence étant le remplacement de 9,3 gr de β -glycérophosphate de sodium par 7,20 gr d' α -glycérophosphate de sodium hexahydraté et 2,30 gr de β -glycérophosphate de sodium pentahydraté.

Il a été isolé 5,5 gr de sel de baryum correspondant à un rendement d'environ 53 pour 100, dont l'analyse nous a donné les résultats suivants :

P pour 100 : 8,89

Ba pour 100 : 41,12

P/Ba : 0,95

Molécules de IO_4H consommées par atome de P : 0,75

Fonctions aldéhydiques par atome de P après oxydation périodique : 1,47.

Le produit isolé est donc constitué par un mélange de α et β glycérophosphate. La proportion entre les 2 isomères n'a pas été trouvée modifiée de façon notable à la suite des manipulations effectuées pour l'isolement.

CONCLUSION

Les résultats analytiques montrent que le corps extrait après transfert est l' α -glycérophosphate exempt d'isomère β . Les essais complémentaires effectués prouvent que s'il avait existé une quantité notable de β -glycérophosphate dans le milieu réactionnel, celui-ci n'aurait pu échapper à l'isolement. Le transfert s'est donc effectué exclusivement sur une fonction alcool primaire du glycérol.

CHAPITRE II

SYNTHESE ET ISOLEMENT D'UN SORBITOLPHOSPHATE

Nous avons vu que, dans le cas où l'accepteur est le glycérol, le transfert se fait exclusivement sur une fonction alcool primaire. Il nous a paru intéressant de rechercher s'il en serait de même pour un autre accepteur, le sorbitol par exemple.

Afin de rendre l'expérience plus démonstrative, nous avons également fait varier le donateur. Le phénylphosphate a remplacé le p.nitrophénylphosphate.

A/- REACTION ENZYMATIQUE.-

Dans un ballon de 10 litres ont été introduits successivement :

- (Solution $\frac{M}{50}$ de phénylphosphate ajustée à pH 5,2 1000 ml
- (Solution aqueuse de sorbitol (900 gr de sorbitol dissous dans 1000 ml d'eau distillée)
- (Tampon acétique M à pH 5,2 500 ml
- (Eau distillée 2000 ml

Le mélange a été porté à 38° au bain-marie, puis additionné de :

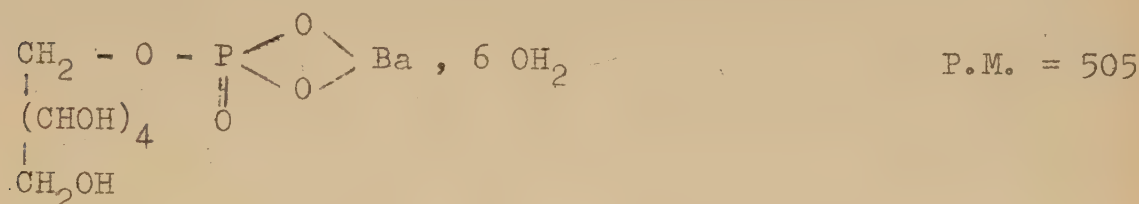
- (Suspension de 0,50 gr de préparation partiellement purifiée de feuilles de belladone dans 100 ml d'eau distillée.
 - (Eau distillée à 37° - q.s pour 5000 ml
- et enfin mis à l'étuve à 37°

B/- ISOLEMENT DE L'ESTER PHOSPHORIQUE FORME

L'enzyme a été inactivé après un séjour de 11 heures à l'étuve à 37°, et l'isolement de l'ester a été conduit exactement comme dans le cas du glycérol. Mais au lieu de concentrer la liqueur jusqu'à obtention d'un liquide sirupeux, la liqueur a ici été concentrée à un volume de 3 litres, et additionnée de 2 volumes d'éthanol à 90 pour 100, soit 6 litres.

C/- CONSTITUTION DU PRODUIT OBTENU.-

Nous avons obtenu environ 1,50 gr d'un corps correspondant à la formule :



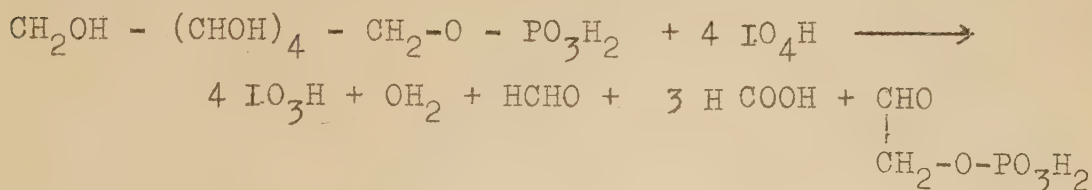
et dont l'analyse a donné les résultats suivants :

P pour 100 calculé : 6,13 ; trouvé : 6,07

Ba pour 100 calculé : 27,12 ; trouvé : 27,70

P/Ba calculé : 1,00 ; trouvé : 0,96

De plus, une solution M/100 d'acide sorbitol-1-phosphorique a été préparée à partir de ce sel de baryum et soumise à l'oxydation par l'acide periodique. Les déterminations analytiques effectuées à la suite de cette oxydation periodique montrent que celle-ci se fait bien selon le schéma classique :



-IO ₄ H consommé (en mol. par atome de P)	théorie : 4,00
	trouvé : 4,12
-Fonctions aldéhydiques par atome de P	théorie : 2,00
	trouvé : 2,25
-H COOH (en mol. par atome de P)	théorie : 3,00
	trouvé : 3,02

Un ester d'une fonction alcool secondaire voisine d'une fonction alcool primaire ne réduirait que trois molécules d'acide périodique en libérant deux molécules d'acide formique. Un ester d'une des fonctions alcooliques centrales serait vraisemblablement oxydé d'une façon analogue au glucose-2-phosphate, COURTOIS et RAMET (22) : réduction de trois molécules d'oxydant avec apparition d'un acide formique dans une première phase, puis suroxydation de l'ester phosphorique du dialdéhyde tartronique.

Nos résultats montrent donc clairement que le transfert du radical phosphoré s'est effectué sur une fonction alcool primaire du sorbitol.

CONCLUSION

Nous avons isolé deux esters phosphoriques obtenus par transfert du radical phosphoré sous l'influence de la phosphatase de la feuille de belladone. Le donateur a été soit le p.nitrophénylphosphate, soit le phénylphosphate, tandis que l'accepteur était le glycérol ou le sorbitol.

L'analyse des corps isolés, glycérophosphate et sorbitolphosphate, montre que le transfert a eu lieu préférentiellement sur une fonction alcool primaire de l'accepteur.

Ainsi l'acide α -glycérophosphorique est l'isomère le plus facilement synthétisé par action transférante comme il l'est par la réversibilité d'action de la phosphatase ou par l'intermédiaire des kinases. Ces faits tendent à indiquer que l'isomère α constitue la forme biologique des acides glycérophosphoriques.

R E S U M E

et

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

I - Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'action transférante de quatre phosphatases empruntées à des préparations de sucres de fruits (orange, pomme), de feuilles (belladone) et de graines (moutarde blanche). Les trois premières étaient partiellement purifiées par précipitation acétonique; la dernière résultait d'une purification par relargage au sulfate d'ammonium et précipitation fractionnée par l'acétone.

Deux monoesters phosphoriques de phénols furent utilisés comme donateurs : le phénylphosphate et le p.nitrophénylphosphate.

A/- Quelques essais préliminaires pratiqués avec les préparations d'orange et de pomme nous ont permis de préciser les conditions expérimentales, d'éprouver les techniques de dosage et d'apprécier l'activité des deux enzymes tant au point de vue de l'hydrolyse qu'à celui du transfert sur le méthanol. Les préparations d'orange et de pomme ont montré des activités transférantes très voisines.

B/- Nous avons procédé à des essais de transfert, à partir des deux donateurs, sous l'influence des préparations d'orange et de pomme, sur un certain nombre de composés alcooliques accepteurs : les deux préparations ont manifesté, outre des activités transférantes similaires, la même spécificité.

Les meilleurs accepteurs sont les alcools ne renfermant pas d'autres fonctions dans leur molécule et, parmi ceux-ci, les alcools primaires comparativement aux alcools secondaires. Les oses et holosides se comportent en accepteurs médiocres et ceci d'autant plus que leur poids moléculaire est plus élevé.

Les essais conduits parallèlement avec les deux donateurs, tous les autres éléments de la réaction étant identiques, montrent que le p.nitrophénylphosphate permet toujours d'obtenir un transfert supérieur à celui observé avec le phénylphosphate.

C/- Nous avons procédé à des essais de transfert, à partir des deux donateurs, avec les préparations de belladone et de moutarde blanche, en les comparant à celles d'orange et de pomme. Ces expériences ont montré que la belladone était douée d'une activité hydrolysante et transférante nettement plus grande que celle des préparations similaires d'orange et de pomme. Au contraire, la préparation de moutarde, tout en manifestant une activité hydrolysante très supérieure à celle des trois autres préparations, se montra très faible au point de vue de l'action transférante.

Il nous a paru intéressant de chercher à expliquer cette médiocre activité : nous n'avons pu mettre en évidence ni la présence d'un inhibiteur de transfert non éliminé au cours de la purification de l'enzyme, ni l'élimination d'un activateur spécifique due à cette purifica-

tion. Par contre, nous avons pu montrer que le faible transfert observé était dû, dans une certaine mesure, à l'hydrolyse relativement rapide de l'ester formé par transfert et à une sensibilité particulière de l'enzyme de moultarde vis-à-vis de l'accepteur à concentrations relativement élevées.

D/- L'étude des divers facteurs intervenant dans la réaction de transfert nous a conduit aux conclusions suivantes :

L'augmentation de la concentration en accepteur entraîne un accroissement du transfert; au contraire, l'augmentation de la concentration en donateur produit l'effet inverse. Dans le cas du p.nitrophénylphosphate cette diminution peut résulter d'une inhibition de l'enzyme par les quantités croissantes de p.nitrophénol libéré, et aussi d'une inhibition par le donateur lui-même.

L'augmentation de la concentration de l'enzyme n'a pas d'effet appréciable sur le transfert.

Si l'on observe l'influence de la durée de réaction sur la valeur du transfert, on constate que celle-ci augmente rapidement dans une première phase puis reste stable : le transfert ne diminue pas sensiblement jusqu'à l'hydrolyse totale du donateur.

II - Dans la deuxième partie de notre travail nous avons tenté, en tenant compte des enseignements tirés des essais précédents, de contrôler la réalité de la réaction de transfert en isolant l'ester obtenu. Nous avons effectué, à l'aide de la préparation de belladone, la synthèse du glycérophosphate et du sorbitolphosphate.

Ces esters ont été isolés, après élimination de l'orthophosphate libre sous forme de phosphate tribaryti-

que, par précipitation à l'état de sels neutres de baryum en milieu fortement alcoolique à pH 7,5.

Leur analyse a montré qu'ils répondaient respectivement aux formules d'un α -glycérophosphate de baryum trihydraté et d'un α -sorbitolphosphate de baryum hexahydraté, tous les deux exempts d'isomère β .

Nous avons cependant vérifié que, si du β -glycérophosphate s'était formé au cours du transfert, il n'aurait pu ni échapper à l'isolement, ni se transposer en son isomère α au cours de cette opération.

Dans ces conditions, nous pouvons admettre que le transfert du radical orthophosphorique, sous l'influence de la phosphatase de la feuille de belladone, s'est effectué préférentiellement sur une fonction alcool primaire du polyol accepteur.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.).- Arch. Sci. Biologique, 1955, 39, 630.
- 2 - ANAGNOSTOPOULOS (C.) et LINO (A.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1957, 39, 781.
- 3 - APPLEYARD (J.).- Biochem. Jl. 1948, 42, 596.
- 4 - AXELROD (B.).- J. Biol. Chem. 1948, 172, 1.
- 5 - AXELROD (B.).- J. Biol. Chem., 1948, 176, 295.
- 6 - AXELROD (B.).- Science 1951, 114, 525.
- 7 - BAILLY (M.C.).- Bull. Soc. Chim. France 1942, p.314, 340, 405, 421; et Th.Doct.Sc.Phys., Paris, 1941.
- 8 - BERGMANN (M.) et FRAENKEL-CONRAT (H.).- J. Biol. Chem. 1937, 119, 707.
- 9 - BOURQUELOT (E.) et BRIDEL (M.).- Journ. Pharm. et Chim. 1912, 5, 569.
- 10 - BRAWERMAN (G.) et CHARGAFF (E.).- J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 4113.
- 11 - BRAWERMAN (G.) et CHARGAFF (E.).- J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 2020.
- 12 - BRIGGS (A.P.).- J. Biol. Chem. 1922, 53, 13.
- 13 - BUBLITZ (C.) et KENNEDY (E.P.).- J. Biol. Chem. 1954, 211, 951.
- 14 - COPAUX (H.).- C.R. Ac. Sc. 1921, 173, 656.
- 15 - COURTOIS (J.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1938, 20, 1393.
- 16 - COURTOIS (J.).- Th. Doct. Sc. Phys. Paris 1938.
- 17 - COURTOIS (J.).- Jl. Pharm. et Chim. 1939, 29, 433.

- 18 - COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1954, 36, 1115.
- 19 - COURTOIS (J.) et BIGET (P.).- Enzymologia 1942, 10, 234.
- 20 - COURTOIS (J.) et PEREZ (C.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1948, 30, 195.
- 21 - COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1957, 39, 715.
- 22 - COURTOIS (J.) et RAMET (M.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1945, 27, 610.
- 23 - DAVISON-REYNOLDS (M.M.), BARRULKO (R.B.) et LEMON (H.M.).- Enzymologia 1954, 17, 145.
- 24 - DESJOBERT (A.).- Th. Doct. Sc. Phys. Paris 1950.
- 25 - FLEURY (P.) et PARIS (R.).- J. Pharm. et Chim. 1933, 18, 470.
- 26 - FLEURY (P.) et LE DIZET (L.).- Bull. Soc. Chim. France 1957, 738.
- 27 - FOLLEY (S.J.) et KAY (H.D.).- Biochem. Jl. 1935, 29, 1837.
- 28 - GREEN (H.) et MEYERHOF (O.).- J. Biol. Chem. 1953, 197, 347.
- 29 - HANES (C.S.), HIRD (F.J.R.) et ISHERWOOD (F.A.).- Nature, Lond. 1950, 166, 288.
- 30 - JOSEPH (G.).- Th. Doct. Univ. Pharm. Paris 1948.
- 31 - KALCKAR (H.).- Biochem. Jl. 1939, 33, 631.
- 32 - KALCKAR (H.).- Enzymologia 1939, 5, 365.
- 33 - KASTHE (J.H.) et LOEVENHARDT (A.S.).- Amer. Chem. Journ. 1900, 24, 491.
- 34 - KAY (H.D.).- Biochem. Jl. 1928, 22, 855.
- 35 - KAY (H.D.) et LEE (E.).- J. Biol. Chem. 1931, 91, 135.
- 36 - KHORSAND (M.).- Th. Doct. Sc. Phys. Paris 1951.
- 37 - LONDON (M.) et HUDSON (P.B.).- Biochim. Biophys. Acta 1955, 17, 485.

- 38 - MAC KENZIE (A.S.).- Brit. Dental. Journ. 1933, 54, 153.
- 39 - MARTLAND (M.) et ROBISON (R.).- Biochem. Jl. 1927, 21, 665.
- 40 - MEYERHOF (O.).- Biochem. Z. 1927, 183, 176.
- 41 - MEYERHOF (O.) et GREEN (H.).- J. Biol. Chem. 1949, 178, 655.
- 42 - MEYERHOF (O.) et GREEN (H.).- J. Biol. Chem. 1950, 183, 377.
- 43 - MORII (M.).- Arb. Anat. Inst. Kaiserlichen Univ. Kyoto 1931, 3, 33.
- 44 - MORTON (R.K.).- Nature 1953, 172, 65.
- 45 - MORTON (R.K.).- The physical chemistry of enzymes. Disc. Farad. Soc. 1955, 20, 149.
- 46 - OHLMEYER (P.).- Z. physiol. Chem. 1944, 282, 1.
- 47 - OHMORI (Y.).- Enzymologia 1937, 4, 217.
- 48 - PRATESI (P.).- Ann. Chimica Applicata 1937, 27, 321.
- 49 - PRATESI (P.).- Ann. Chimica Applicata 1937, 27, 382.
- 50 - PRATESI (P.).- Ann. Chimica Applicata 1937, 27, 309.
- 51 - RABATE (J.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1935, 17, 572.
- 52 - RAE (J.J.), KAY (H.D.) et KING (E.J.).- Biochem. Jl. 1934, 28, 143.
- 53 - ROCHE (J.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1931, 13, 841.
- 54 - ROCHE (J.) et COURTOIS (J.).- Exp. Ann. Bioch. Méd. Masson Edit. Paris 1944, 4, 219.
- 55 - SOLS (A.) et CRANE (R.K.).- J. Biol. Chem. 1954, 206, 925.
- 56 - SUZUKI (B.) et MARUYAMA (T.).- Proceed. Imp. Acad. Tokyo 1930, 6, 67.
- 57 - THIVOLLE (L.).- C.R. Soc. Phys. Biol. de France, 1944, 18, n°78.
- 58 - THOAI (N.), ROCHE (J.) et DANZAS (E.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1944, 26, 1139.
- 59 - TUNIS (M.) et CHARGAFF (E.).- Biochim. Biophys. Acta 1956, 21, 204.
- 60 - WU (H.).- J. Biol. Chem. 1922, 51, 33 et 39.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	2
 <u>PREMIERE PARTIE</u> -----	
ETUDE DU TRANSFERT AVEC DIFFERENTES PHOSPHATASES D'ORIGINE VEGETALE	9
<u>CHAPITRE I - MATERIEL ET TECHNIQUES</u>	9
A/- Donateurs en phosphore	9
B/- Préparations enzymatiques	10
Orange	10
Pomme	11
Belladone	12
Moutarde	12
C/- Protocole des expériences	14
D/- Techniques analytiques	15
<u>CHAPITRE II - ESSAIS PRELIMINAIRES D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT</u>	22
A/- Etude des préparations d'orange	22
B/- Etude des préparations de pomme	34
<u>CHAPITRE III - ACTION TRANSFERANTE DES PREPARATIONS D'ORANGE ET DE POMME SUR DIVERS COMPO- SES ALCOOLIQUES</u>	38
A/- Comparaison de l'activité et de la spécifi- cité des deux enzymes	41

	<u>Pages</u>
B/- Différents composés essayés comme accep- teurs	41
C/- Influence de la nature du donateur	43
Conclusions	44
 <u>CHAPITRE IV - ESSAIS DE TRANSFERT AVEC LES PRE- PARATIONS DE MOUTARDE ET DE BELLA- DONE</u>	
	45
A/- Comparaison des activités des préparations de moutarde, de belladone, d'orange et de pomme	45
B/- Essais en vue de chercher à préciser les causes de la médiocre action transférante de la préparation de moutarde	49
1- Comparaison de l'action hydrolysante de la moutarde sur le phénylphosphate et le glycérophosphate	50
2- Influence de la concentration de l'accep- teur sur l'action transférante des diver- ses préparations	52
3- Action transférante des préparations as- sociées	55
4- Hypothèse de deux enzymes distincts	57
Conclusions	59
 <u>CHAPITRE V - ETUDE DE QUELQUES POINTS DE LA CINE- TIQUE DU TRANSFERT PAR LA PHOSPHATA- SE D'ORANGE</u>	
	60
A/- Influence de la concentration en accepteur	60
B/- Influence de la concentration en substrat	61
C/- Influence de la concentration en enzyme ..	66
D/- Influence de la durée de réaction	67
Conclusions	71

DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT D'ESTERS FORMES PAR TRANSFERT ENZYMATIQUE DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE	72
INTRODUCTION	72
<u>CHAPITRE I - SYNTHESE ET ISOLEMENT D'UN GLYCERO-</u> <u>PHOSPHATE</u>	75
A/- Réaction enzymatique	75
B/- Isolement de l'ester formé	77
C/- Purification de l'ester	79
D/- Constitution du produit obtenu	80
E/- Discussion de la nature du produit obtenu	82
Conclusions	85
<u>CHAPITRE II - SYNTHESE ET ISOLEMENT D'UN SORBITOL-</u> <u>PHOSPHATE</u>	86
A/- Réaction enzymatique	86
B/- Isolement de l'ester formé	87
C/- Constitution du produit obtenu	87
Conclusion de la deuxième partie	88
RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES	90
BIBLIOGRAPHIE	94

=====

Vu, le Doyen

R. FABRE

Vu, le Président de thèse

J. COURTOIS

Vu et permis d'imprimer,
le Recteur
de l'Académie de Paris

Jean SARRAILH

